

# PARTHENOGENESE

– Een literatuurstudie over natuurlijke parthenogenese bij gewervelde dieren met aparte bibliografie.

– Een experimentele studie over parthenogenetische stimulatie van muize – eicellen, de vroege in vitro ontwikkeling en pogingen tot bevruchting van deze parthenogenonten.

## EEN PROEFSCHRIFT SCHRIJVEN. . . .

Want zij die b.v. een proefschrift schrijven, dat immers alleen bestemd is om aan het oordeel van enige professoren te worden onderworpen, en die dus de strengste en meest deskundige critici niet vrezen, zijn, dunkt me, meer te beklagen dan te benijden, daar ze zich eindeloos aftobben. Ze voegen toe, veranderen, schrappen, herstellen weer, herzien, werken het weer geheel en al om, laten het graag anderen zien, houden het *negen jaar* in portefeuille en zijn nooit tevreden met het resultaat. De beloning, die ze er ten slotte voor krijgen — immers de lof van een enkeling — is wel heel duur betaald met al hun zwoegen, zweten en gebrek aan het zoetste, wat er bestaat: de slaap. Voeg hierbij nog dat dit alles gaat ten koste van hun gezondheid, dat ze daardoor humeurig, lelijk, bijziende of zelfs blind worden, tot armoede vervallen, bij ieder uit de gunst zijn, dat ze alle genoegens moeten verzaken, dat ze vóór hun tijd oud zijn, ontijdig sterven en wat dies meer zij.

Desiderius Erasmus (1515)

Moriae Encomium

(De Lof der Zotheid)

Het hier beschreven onderzoek werd mogelijk gemaakt mede dankzij een subsidie van de Nederlandse Organisatie voor Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek.

# PARTHENOGENESE

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE

GENEESKUNDE

AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT ROTTERDAM

OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS

PROF. DR. J. SPERNA WEILAND

EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.

DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATSVINDEN OP

VRIJDAG 30 SEPTEMBER 1983 DES NAMIDDAGS

TE 3.45 UUR

DOOR

GERARD ANDRIES JAN SIMEON

VAN MARLE

geboren te OEGSTGEEST

**PROMOTOR:                    PROF. DR. G.H. ZEILMAKER**

**CO – REFERENTEN:    PROF. DR. J.F. JONGKIND**  
**PROF. DR. P. KREDIET**

Voor Alexander,  
Michiel en  
Wiggert.

## VOORWOORD

De voortplanting bij zoogdieren geschiedt door middel van van mannelijke en vrouwelijke individuen afkomstige geslachtscellen. Dit zijn speciaal voor de voortplanting gevormde cellen afkomstig uit de geslachtsklieren. Bij vrouwelijke dieren worden deze cellen in het ovarium gevormd en spreekt men van eicellen indien zij zover zijn gerijpt dat bevruchting plaats kan vinden. Bij de mannelijke dieren worden deze cellen in de testis gevormd. Na volledige rijping spreekt men van zaadcellen.

De erfelijkheidsfactoren liggen verankerd op chromosomen welke zich in de celkernen bevinden. Deze chromosomen vormen gezamenlijk het genetische materiaal van de cel. Tijdens de normale bevruchting komt het genetische materiaal van een zaadcel samen met dat van de eicel. Hierdoor wordt de haploïde eicel tot een diploïd embryo getransformeerd.

Een hiervan afwijkend mechanisme is de voortplanting door middel van parthenogenese. Dit is een proces waarbij nieuwe individuen uit eicellen ontstaan zonder bijdrage van mannelijke geslachtscellen. Deze wijze van voortplanten, die in de natuur vooral bij de lagere diersoorten voorkomt, is geruime tijd geleden ook langs experimentele weg bij gewervelde dieren geïnduceerd. Door het beschikbaar komen van geschikte kweekmedia voor rijping, bevruchting en ontwikkeling in vitro van zoogdiereicellen en door de sterk verbeterde technieken welke manipulatie met deze eicellen mogelijk maken, is men er later ook bij zoogdieren in geslaagd parthenogenetische ontwikkelingen te induceren. Door verschillende aktivatiemethoden toe te passen kan men zowel haploïde als diploïde parthenogenonten verkrijgen. Bovendien treden bij parthenogenese, naast de genetische afwijkingen, nog andere verschillen op ten opzichte van de bevruchting. Het betreft hier de aktiverende rol die de zaadcel tijdens de bevruchting op de eicel uitoefent terwijl men eveneens de cytoplasmatische bijdrage van de zaadcel mist. Door deze verschillen kan parthenogenese toegepast worden als een model voor een aantal verschillende richtingen van onderzoek zoals:

1. de effecten van gehele of bijna gehele genetische homozygotie van een zoogdier – embryo
2. de mogelijkheid een haploïde embryonale ontwikkeling te stimuleren en het stadium te onderzoeken waarop de haploïdie lethaal wordt
3. het verkrijgen van een kweek van haploïde cellen in vitro voor cytogenetische studies zoals b.v. onderzoek naar recessieve factoren op cellulair niveau en celfusiestudies
4. het aktivatieproces van de eicel door de zaadcel
5. de mogelijke niet erfelijke bijdrage van de bevruchtende zaadcel aan de verdere embryonale ontwikkeling.

De inhoud van dit proefschrift is in twee delen gesplitst.

Het eerste deel is het resultaat van een literatuurstudie. Hierin wordt als inleiding eerst nader ingegaan op het begrip parthenogenese, de diverse definities die eraan gegeven zijn en de verschillende wijzen waarop men bepaalde vormen en typen van parthenogenese heeft onderscheiden en ingedeeld in een klassifikatie. Na deze korte toelichting in het eerste hoofdstuk wordt in de onderscheidenlijke paragrafen van het tweede hoofdstuk het voorkomen van natuurlijke parthenogenese beschreven bij achtereenvolgens vissen, amfibien, reptielen, vogels, zoogdieren en de mens. Het eerste deel van het proefschrift wordt afgesloten met een bibliografie van de hiervoor genoemde onderwerpen. Deze bibliografie, die ruim 600 referenties omvat, is de eerste in zijn soort en tot medio 1982 zo volledig mogelijk gemaakt ten aanzien van de publikaties in de Anglosaksische talen terwijl bovendien enige Oosteuropese literatuur is opgenomen.

Het tweede deel van dit proefschrift, hoofdstuk III tot en met Hoofdstuk VIII, behandelt het eigen experimentele werk. Met deze tweedeling is tevens het doel van het proefschrift aangegeven. Enerzijds wordt beoogd een compleet overzicht te geven over de huidige stand van zaken ten aanzien van beschrijvingen over natuurlijke parthenogenese bij gewervelde dieren terwijl anderzijds een bijdrage wordt geleverd aan de kennis over verschillende aspecten van experimentele parthenogenese bij zoogdiereicellen.

## INHOUD

	VOORWOORD	6
	INHOUD	8
	HOOFDSTUK I	
	INLEIDING TOT DE LITERATUUR EN OMSCHRIJVINGEN VAN HET BEGRIP PARTHENOGENESE.	
I-1	De eerste beschrijvingen van parthenogenese	14
I-2	Verskillende indelingen van parthenogenese door latere onderzoekers	
I-3	Een nieuwe indeling van mogelijke ontwikkelingspatronen bij gewervelde dieren	16
		21
	HOOFDSTUK II	
	NATUURLIJKE PARTHENOGENESE BIJ VERTEBRATEN, EEN LITERATUURSTUDIE MET BIBLIOGRAFIE	
II-1	Inleiding	26
II-2	Natuurlijke parthenogenese bij vissen	27
II-2.1	Cypriniidae	28
II-2.1.1	Poeciliae	28
II-2.1.2	Poeciliopsis	35
II-2.1.3	Carassius	42
II-2.2	Overige vissoorten	46
II-2.3	Samenvatting en conclusies	47
II-3	Natuurlijke parthenogenese bij amfibieën	49
II-3.1	Inleiding	49
II-3.2	Urodela: salamanders	50
II-3.3	Ranaïdae: kikkers	55
II-3.4	Samenvatting en conclusies	59



II-4	Natuurlijke parthenogenese bij reptielen	61
II-4.1	Eerste aanwijzingen voor het mogelijk voorkomen van natuurlijke parthenogenese bij reptielen.	61
II-4.2	Squamata: Suborde Sauria.	62
II-4.2.1	Lacertidae: hagedissen van de Oude Wereld	62
II-4.2.2	Xantusiidae: Nachthagedissen.	66
II-4.2.3	Teiidae: Hagedissen van de Nieuwe Wereld	67
II-4.2.3.1	Gymnophthalmus underwoodi	67
II-4.2.3.2	Leposoma percarinatum	68
II-4.2.3.3	Kentropyx borckianus	68
II-4.2.3.4	Cnemidophorus	68
II-4.2.4	Gekkonidae: Gekko's	80
II-4.2.5	Iguanidae: Leguanen	83
II-4.2.6	Agamidae: Hagedissen van de Oude Wereld	84
II-4.2.7	Chamaeleontidae: Kameleons	87
II-4.3	Squamata: Suborde Serpentes (slangen)	87
II-4.4	Schildpadden en Krokodillen	90
II-4.5	Samenvatting en conclusies	91
II-5	Natuurlijke parthenogenese bij vogels	93
II-5.1	Inleiding	93
II-5.2	Kalkoenen en kippen	94
II-5.3	Samenvatting en conclusies	111
II-6	Natuurlijke parthenogenese bij zoogdieren	114
II-6.1	Inleiding	114
II-6.2	Ovariële parthenogenese of follikelatresie ?	114
II-6.3	Teratomen	120
II-6.3.1	Testisteratomen	121
II-6.3.2	Ovariumteratomen	122
II-6.4	Eicelveroudering of parthenogenese in het oviduct	125
II-6.5	Complete parthenogenese bij zoogdieren	126
II-6.6	Samenvatting en conclusies	128
II-7	Natuurlijke parthenogenese bij de mens	130
II-7.1	Parthenogenese in de theologie	130
II-7.2	Parthenogenese in ovariumfollikels	131
II-7.3	Teratomen	132
II-7.4	Androgenese: de mola – zwangerschap (Mola hydatidiformis)	139
II-7.5	Complete parthenogenese bij de mens ?	144
II-7.6	Samenvatting en conclusies	146

## HOOFDSTUK III

EXPERIMENTELE PARTHENOGENESE BIJ  
ZOOGDIEREN

III – 1	Historisch overzicht tot 1960	231
III – 2	Experimentele parthenogenese bij zoogdieren na 1960	248
III – 3	Literatuurverwijzingen, systematisch ingedeeld volgens de verschillende toegepaste technieken op auteur	249

## HOOFDSTUK IV

## INLEIDING TOT HET EIGEN ONDERZOEK

IV – 1	Enige gegevens over de voortplanting van de laboratoriummuis	253
IV – 1.1	Ontstaan van primordiale geslachtscellen en oögonia	253
IV – 1.2	Oöcytrijping en follikelgroei	256
IV – 1.3	De meiose: vorming van primaire en secundaire oöcyten	259
IV – 1.4	Ovulatie	263
IV – 1.5	Bevruchting	266
IV – 1.6	Pre – implantatie ontwikkeling	266
IV – 1.7	Zwangerschap en pseudozwangerschap	267
IV – 1.8	Oestrus – cyclus	267
IV – 2	Materialen en methoden	268
IV – 2.1	Proefdieren	268
IV – 2.2	Huisvesting proefdieren	269
IV – 2.3	Kweek – medium	269
IV – 2.4	Detectie van spontane ovulatie	270
IV – 2.5	Inductie van super – ovulatie	270
IV – 2.6	Eicel – isolatie	271
IV – 2.7	Manipulatie van eicellen en embryo's	271
IV – 2.8	Anesthesie	271
IV – 2.9	Vasectomie	271
IV – 2.10	Kweekomstandigheden	272
IV – 2.11	Bereiden van een zaadcel – suspensie	272
IV – 2.12	In vitro bevruchting	273
IV – 2.13	"Kaalmaken" van eicellen	273

IV – 2.14	Chromosoompreparaten	273
IV – 2.15	Statistiek	274

## HOOFDSTUK V

### PARTHENOGENESE NA INCUBATIE IN EEN HYALURONIDASE – OPLOSSING

V – 1	Inleiding	275
V – 2	Materialen en methoden	276
V – 2.1	Hyaluronidase – aktivatie	276
V – 2.2	Aktivatie ten gevolge van explantatie en voorincubatie in normaal medium	277
V – 3	Resultaten en discussie	277
V – 3.1	De invloed van de ouderdom van de eicel	277
V – 3.2	Verdere in vitro ontwikkeling van geactiveerde eicellen	279
V – 3.3	De invloed van de voor de aktivatie noodzakelijke manipulaties van de eicellen	281
V – 3.4	Verdere in vitro ontwikkeling van uitsluitend door het manipuleren geactiveerde eicellen	281
V – 4	Conclusies	282

## HOOFDSTUK VI

### PARTHENOGENESE NA INCUBATIE IN EEN MEDIUM MET EEN NIET – FYSIOLOGISCHE OSMOTISCHE WAARDE

VI – 1	Inleiding	284
VI – 2	Materialen en methoden	286
VI – 2.1	De invloed van de osmolariteit van het aktivatiemedium	286
VI – 2.2	De invloed van de lengte van de incubatieperiode in het aktivatiemedium	287

VI – 2.3	De invloed van de post – ovulatoire leeftijd van de eicellen bij een constante incubatieperiode en een gelijk aktivatiemedium	287
VI – 3	Resultaten en discussie	287
VI – 3.1	De invloed van de osmolariteit van het aktivatiemedium	287
VI – 3.1.1	De invloed van de osmolariteit van het aktivatiemedium op de aktivatiefrequentie en de parthenogenonttype – differentiatie	287
VI – 3.1.2	De invloed van de osmolariteit van het aktivatiemedium op de verdere in vitro ontwikkeling	295
VI – 3.2	De invloed van de lengte van de incubatieperiode	296
VI – 3.3	De invloed van de post – ovulatoire leeftijd van de eicellen bij een constante incubatieperiode en een gelijk aktivatiemedium	303
VI – 4	Conclusies	306

## HOOFDSTUK VII

### POGINGEN TOT IN VITRO BEVRUCHTING VAN PARTHENOGENONTEN

VII – 1	Inleiding	310
VII – 2	Materiaal en methoden	312
VII – 3	Resultaten	326
VII – 3.1	In vitro bevruchting van op type geselekteerde parthenogenonten na incubatie in anisotonisch medium en een korte hyaluronidasebehandeling	326
VII – 3.2	In vitro bevruchting van ongeselekteerde parthenogenonten en eicellen onmiddellijk aansluitend op een korte parthenogenetische aktivatie in anisotonisch medium	326
VII – 4	Diskussie	330
VII – 5	Conclusies	334

## HOOFDSTUK VIII

### ONTWIKKELINGSSNELHEID EN ENIGE MORFOLOGISCHE ASPEKTEN VAN VROEGE PARTHENOGENETISCHE EN EMBRYONALE STADIA BEPAALD MET BEHULP VAN VERTRAAGDE MICROSKOPISCHE FILMOPNAMEN

VIII – 1	Inleiding	336
VIII – 2	Materiaal en methoden	340
VIII – 2.1	Proefopstelling	340
VIII – 2.2	Filmanalyses	341
VIII – 3	Resultaten	341
VIII – 4	Diskussie	382
VIII – 5	Conclusies	386
	GERAADPLEEGDE LITERATUUR	388
	SAMENVATTING	414
	SUMMARY	420
	CURRICULUM VITAE	425
	LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN	427
	PERSOONLIJK NAWOORD	428

## HOOFDSTUK I

### INLEIDING TOT DE LITERATUUR EN OMSCHRIJVINGEN VAN HET BEGRIIP PARTHENOGENESE.

#### I-1 De eerste beschrijvingen van parthenogenese

De eerste waarneming en beschrijving van parthenogenese (dat is het ontstaan van nakomelingen uit een geslachtscel zonder de bijdrage van een geslachtscel van het andere geslacht; parthenos = maagd, genesis = ontstaan, wording) dateren reeds uit de vierde eeuw voor het begin van onze jaartelling. Als vervolg op zijn eerder geschreven manuscript *Historia animalum* schreef Aristoteles het uit vijf delen bestaande werk *De generatione animalum*. In het voorwoord van de franse vertaling van Louis (1961) wordt verondersteld dat deze manuscripten tussen 348 en 322 voor het begin van de christelijke jaartelling zijn geschreven. In het negende hoofdstuk van deel drie, getiteld *Voortplanting van insekten*, staat onder andere vermeld "... dat sommige insekten door middel van copulatie gevormd worden, andere spontaan ...". In hoofdstuk 10, *Bijen*, komt hij tot de volgende constatering: "Het ontstaan van bijen is een groot raadsel. Wanneer het juist is dat bepaalde vissen zonder paring ontstaan dan gebeurt hetzelfde waarschijnlijk bij bijen, althans zo lijkt het, te oordelen naar de verschijnselen".

Het zou echter nog meer dan tweeduizend jaar duren alvorens het bestaan van parthenogenese overtuigend bewezen werd. De bekende franse geleerde Réaumur (1737) vermoedde dat luizen nakomelingen kregen zonder enige vorm van geslachtelijke voortplanting. Hij ontwierp dan ook een experiment om dit vermoeden te bewijzen. Hij slaagde er echter zelf niet in om het bewijs te leveren. Dat werd drie jaar later gedaan door zijn leerling Charles Bonnet (**Bonnet, 1745**). Op 20 mei 1740 isoleerde hij een pasgeboren luis en bleef deze luis, welke zich volkomen geïsoleerd verder ontwikkelde, zorgvuldig observeren. Op 1 juni constateerde hij dat er een jong was geboren, in de daarop volgende drie weken volgden er nog 95. Op aanraden van Réaumur herhaalde hij dit experiment. Ook toen kreeg hij een soortgelijk resultaat. Uit een briefwisseling tussen Bonnet en Trembley bleek dat laatstgenoemde vond dat op deze wijze nog geen onomstotelijk bewijs was geleverd voor het bestaan van parthenogenese. Hij achtte het namelijk niet uitgesloten dat een paring voor meerdere generaties mogelijk zou kunnen zijn. Om deze kritiek te kunnen weerleggen kweekte Réaumur opnieuw in een strikt isolement vijf, zes en tien opeenvolgende generaties verschillende soorten luizen. In al deze experimenten kwam hij tot dezelfde resultaten waarmee het bestaan van parthenogenese onweerlegbaar was bewezen.

Ongeveer honderd jaar later stelt **Dzierzon (1845)** in Brieg een theorie op over de bijzondere wijze van voortplanten bij de bijen. Dzierzon maakte deel uit van een gezelschap bijenhouders welke een eigen verenigingsblad, **Bienezeitung** uitgaven. In dit blad werd een oproep aan de leden gedaan antwoord te geven op bepaalde vragen over verschillende aspecten van de bijenteelt. Als reactie hierop stelt Dzierzon zijn ideeën over de voortplantingswijze bij de bijen op schrift. Hij ontwikkelt deze theorie verder en publiceert de meer uitgebreide versie in 1848: **Theorie und Praxis des neuen Bienen fremde oder neue Art der Bienezucht mit dem günstigsten Erfolge, angewendet und dargestellt von Dzierzon, Brieg, 1848**. In deze theorie spreekt Dzierzon de overtuiging uit "dass die Drohneneier einer Befruchtung nicht bedürfen, die Mitwirkung der Drohnen aber Schlechterdings notwendig ist, wenn Arbeitsbienen erzeugt werden sollen"... Die Tätigkeit des Eierstockes beginnt im normalen Zustande erst nach der Begattung, ist aber nicht notwendig dadurch bedingt, daher manche unbefruchtete Weiber gar keine, während andere Drohneneier legen, und selbst Arbeitsbienen dieses thun, die ich wegen Mangel eines Samenhalters für ganz unfähig zur Begattung halte. Dergleichen Eier sind nun nach meiner Ueberzeugung zur Erzeugung der Drohnen hinreichend, während das Ei, aus welchem eine Königin oder Arbeitsbiene sich entwickeln soll, mit dem gefüllten Samenhälter in Berührung treten muss". Dat zijn theorie revolutionair is en weinig kans op acceptatie heeft realiseert Dzierzon zich blijkens zijn opmerking "Es ist diesfreilich nur eine hypothese und wird es wohl auch bleiben, ...."

Korte tijd later wordt deze theorie uitgebreid door de zoölogen **Von Siebold (1856)** en **Leuckart (1858)**. Met name de rol van Von Siebold is van groot belang geweest voor de ontwikkeling van het inzicht in de parthenogenese. Samen met **Richard Hertwig** is hij te beschouwen als de wetenschappelijke grondlegger van de "leer van de parthenogenese".

Von Siebold (1856) beschrijft het voorkomen van parthenogenese bij verschillende vlindersoorten. Hij ondersteunt de theorie van Dzierzon over de ontstaanswijze van bijen en breidt deze theorie verder uit. Tevens definieert hij als eerste parthenogenese: "parthenogenese is het verschijnsel dat echte wijfjes, dat wil zeggen individuen voorzien van volledig ontwikkelde vrouwelijke geslachtsorganen, eieren leggen, die zonder bevrucht te zijn, in staat zijn zich te ontwikkelen". Ondanks deze duidelijke definitie had Von Siebold toch nog geen juiste voorstelling over parthenogenese getuige zijn opmerking: "dat levendbarende luizen geen wijfjes zijn die eieren leggen welke in staat zijn zich, zonder bevrucht te zijn, te ontwikkelen maar dat het ongeslachtelijke larfachtige individuen zijn die zeer sterk verschillen van de echte luize – wijfjes".

Ook **Huxley (1858)** ondersteunt het bestaan van "ongeslachtelijke larfachtige individuen en geeft de kiemcellen de naam "pseudova" en de organen waarin ze gevormd worden de "pseudovaria". **Claus (1864)** wijst op de onjuistheid van

bovengenoemd onderscheid en toont aan dat "parthenogenetische kiemcellen en eicellen één en eenzelfde type geslachtscellen zijn".

Met dit werk is een eind gekomen aan de speculaties en discussies over de ware aard van de parthenogenese.

## I – 2 Verschillende indelingen van parthenogenese door latere onderzoekers

Sedert de laatste eeuwwisseling worden verschillende meer of minder duidelijke indelingen van de parthenogenese beschreven. Een aantal hiervan zijn ook reeds door **Vandel (1931)** en **Suomalinen (1950)** samengevat.

Een eerste indeling in twee groepen is in 1899 door **Giard** opgesteld. Giard onderscheidde mannelijke en vrouwelijke parthenogenese waarin respectievelijk de mannelijke en de vrouwelijke gameet zich zonder bevruchting ontwikkelt. Het eerste type komt slechts bij lagere planten voor terwijl de vrouwelijke parthenogenese zowel in het planten – als in het dierenrijk vrij algemeen is verbreid.

**Winkler (1908, 1920)** onderscheidt somatische en generatieve parthenogenese: respectievelijk die gevallen waarin geen chromosoom – reductie plaatsvindt en die waarin deze reductie wel optreedt. Wanneer de aanvankelijke chromosoom – reductie later alsnog teniet gedaan wordt, bijvoorbeeld ten gevolge van kernversmelting, spreekt Winkler toch over somatische parthenogenese. Later maakt Winkler (1920) een indeling welke gebaseerd is op het ontstaan van de verschillende geslachten door parthenogenese of geslachtelijke voortplanting:

1. Arrhenotoky: onbevruchte eicellen ontwikkelen zich parthenogenetisch tot mannetjes en bevruchte eieren tot vrouwtjes.
2. Thelytoky: onbevruchte eicellen ontwikkelen zich tot vrouwtjes.
3. Deuterotoky: (= Amphitoky) onbevruchte eicellen kunnen zich zowel tot vrouwtjes als tot mannetjes ontwikkelen.

**Hartman (1909)** baseert zijn indeling op de begrippen haploïdie en diploïdie (respectievelijk in enkelvoud en in duplo aanwezig zijn van een volledige set chromosomen). Evenals de indeling van Winkler voorzagt ook de indeling van Hartman niet in de mogelijkheid om de later ontdekte polyploïde parthenogenese (drie of meer sets chromosomen) in deze indeling in te passen.

**Prell (1923)** onderscheidt apomiktische parthenogenese (parthenogenese in engere zin) en amphimiktische parthenogenese (alle vormen waarin op de een of andere



wijze het haploïde chromosoom – aantal zonder bevruchting tot het diploïde aantal gebracht wordt).

De **apomiktische parthenogenese** wordt onderverdeeld in "zygoïde und azygoïde parthenogenesis", respectievelijk haploïde en diploïde parthenogenese.

**Amphimiktische parthenogenese:** onderscheiden wordt "endomiktische en automiktische parthenogenese", respectievelijk de versmelting van twee eicellen welke van dezelfde kiemcel afstammen en de versmelting van de kern van de eicel met de kern van het poollichaampje (IV – 1.2).

**Vandel (1927)** baseert zijn indeling niet uitsluitend op cytologische kenmerken doch komt op grond van verschillend criteria tot de volgende indeling:

1. facultatieve, arrhenotokische of haploïde parthenogenese
2. accidentele en experimentele parthenogenese
3. diploïde parthenogenese
4. geografische of polyplloïde parthenogenese.

**Ankel (1927)** brengt hier het volgende bezwaar tegen in: door haploïde parthenogenese kunnen zowel mannelijke als vrouwelijke nakomelingen ontstaan en niet uitsluitend vrouwelijke. Ankel meent bovendien dat parthenogenonten die kunstmatig geïnduceerd zijn tot een aparte groep behoren. Hij bepleit dan ook een indeling waarin drie cytologische typen te onderscheiden zijn:

1. automiktische parthenogenese: alle ontwikkelingen uitgaande van een volledig normaal gerijpte eicel welke later door middel van kernfusie diploïd of polyplloïd wordt.
2. generatieve parthenogenese: de parthenogenonten ontwikkelen zich uit normaal gerijpte eicellen zonder dat er later nog verandering in de ploïdie optreedt.
3. somatische parthenogenese: parthenogenonten ontwikkelen zich uit eicellen welke als gevolg van een of meer kernversmeltingen per saldo geen chromosoomreductie ondergaan doch zich met een diploïd of polyplloïd aantal chromosomen ontwikkelen.

Hoewel niet volgens dezelfde definities onderscheiden zowel **Thomsen (1927)** als **Ankel (1929)** drie typen parthenogenese gebaseerd op cytologische gebeurtenissen. Thomsen verdeelt de somatische parthenogenese verder onder in automiktische (door fusie van twee haploïde kernen of endomitose wordt het aanvankelijke haploïde chromosoom – aantal hersteld tot het diploïde aantal) en apomiktische parthenogenese (noch chromosoom – reductie noch kernfusie of iets van dien aard vindt plaats).

Bovendien erkent Thomsen (1927) dat men behalve bovenstaande indeling, gebaseerd op de cytologie, ook indelingen kan maken welke gebaseerd zijn op de

wijze van voortplanten en op de bepaling van het geslacht. Dit laatste was ook reeds door **Winkler (1920)** gedaan. Uitgaande van de manier van voortplanten stelt hij de volgende indeling voor:

A. Tychoparthenogenese: (= incidentele parthenogenese)

Onbevuchte eicellen ontwikkelen zich **soms** parthenogenetisch.

B. Normale parthenogenese. Deze wordt onderverdeeld in:

1. Obligatoire parthenogenese:

Onbevuchte eicellen ontwikkelen zich **altijd** parthenogenetisch. Onderscheiden wordt:

1.1 Constante parthenogenese: alle generaties zijn parthenogenonten.

1.2 Cyclische parthenogenese: een of meer parthenogenetische generaties worden afgewisseld door een tweeslachtige generatie (= heterogamie).

1.3 Paedogenese: eicellen van individuen in het larve-stadium ontwikkelen zich parthenogenetisch (nauw verwant met cyclische parthenogenese).

2. Facultatieve parthenogenese:

Een eicel kan zich zowel parthenogenetisch als door middel bevruchting ontwikkelen.

**Vandel (1931)** maakt in zijn opsomming van diergroepen waarin parthenogenese voorkomt nadrukkelijk de restrictie dat hij slechts die groepen heeft opgenomen waarin complete parthenogenese voorkomt: "parthénogénèse complète, c'est à dire où l'oeuf non fécondé donne naissance à un individu complètement développé". De "parthénogénèse rudimentaire" wordt door Vandel apart behandeld. Evenzo maakt hij onderscheid tussen "parthénogénèse naturelle et artificielle".

In een overzichtsartikel over de evolutie van de mannelijke haploïdie geeft **Whiting (1945)** de voorkeur aan een indeling in haploïde – en diploïde parthenogenese. Wel stelt hij voor om de term haploïd in bredere zin te gebruiken, dit wil zeggen omvattende alle gevallen afkomstig van een enkele gereduceerde vrouwelijke kern. Dus ook die welke later diploïd of zelfs polyploïd zijn geworden.

**Suomalinen (1950)** bespreekt enige voor hem gepubliceerde indelingen in een overzichtsartikel over natuurlijke parthenogenese bij dieren. Suomalinen stelt geen eigen indeling op maar gebruikt de indelingen van Thomsen (1927) en Ankel (1929) bij de bespreking van de verschillende diersoorten met parthenogenese. Hij vult deze indelingen aan door nadrukkelijk te stellen dat diploidie en haploidie bij parthenogenetische dieren gebaseerd moeten zijn op de chromosoomaantallen in de kernen van de geslachtscellen.

In de beschouwing over de theoretisch mogelijke ontwikkelingsrichtingen, waarin

zowel de parthenogenese alsmede de voortplanting door middel van bevruchting is opgenomen, gaat Beatty (1957) uit van een hoofdgroep van zestien verschillende richtingen. De indeling omvat apomiktische (parthenogenetische) ontwikkelingen en amphimiktische ontwikkelingen, d.w.z. ontwikkelingen uitgaande van een bevruchte eicel en is gebaseerd op combinaties van vier cytologische variabelen:

1. Eliminatie van de genetische bijdrage van de zaadcel,
2. Onderdrukking van de vorming van het eerste poollichaampje.
3. Onderdrukking van de vorming van het tweede poollichaampje.
4. Onderdrukking van de eerste klievingsdeling.

Een en ander is schematisch weergegeven op de volgende pagina. De eerste acht mogelijkheden vallen onder de apomiktische ontwikkeling, dat wil zeggen een ontwikkeling zonder de genetische bijdrage van zaadcellen, dus equivalent aan parthenogenese. Een speciale variant hiervan is de gynogenese of pseudogamie. Hieronder wordt verstaan de ontwikkeling van een normaal gerijpte eicel nadat deze cel bevrucht is door een zaadcel met dien verstande dat de zaadcel geen genetische bijdrage aan de verdere ontwikkeling levert. Het effect van het binnendringen van de zaadcel op de eicel, de eicelaktivatie, kan dus normaal optreden terwijl bovendien mogelijke bijdragen tot de verdere ontwikkeling geleverd worden door het niet – genetische materiaal van de zaadcel (de staart, het acrosoom en het middenstuk, de centriool, mogelijk extra chromosomaal chromatine en een geringe hoeveelheid cytoplasma). Beatty erkent echter dat het strikt genomen niet juist is deze vorm onder de parthenogenese te vatten, immers er is wel een bepaalde, niet – genetische bijdrage van de zaadcel mogelijk.

Naast deze acht mogelijkheden onderscheidt Beatty ook acht amphimiktische ontwikkelingswijzen waarin de zaadcellen behalve een aktiverende rol ook een genetische bijdrage leveren.

Tenslotte onderscheidt hij dan nog een groep overige ontwikkelingen waarin hij alles plaatst wat niet in de eerdergenoemde indeling past.

Voor een uitgebreide opsomming van de verschillende voorbeelden en bijbehorende referenties wordt met name naar **Beatty (1957)**, **Vandel (1931)**, en **White (1945)** verwezen.

Tevens wordt verwezen naar figuur III in hoofdstuk IV van dit proefschrift. Daarin wordt een schematische weergave van de meiose gegeven. Een goed begrip hiervan is een vereiste om het bovengenoemde schema van Beatty te kunnen begrijpen. Tenslotte wordt naar figuur II in hoofdstuk III verwezen. Daarin worden de in de eigen experimenten waargenomen typen parthenogenonten en hun ontstaanswijze geïllustreerd.

Ook bij de mens treft men enige afwijkende ontwikkelingsvormen uit dit schema aan. In hoofdstuk II – 7.4 wordt nader ingegaan op deze ontwikkelingsvormen.

Genetische bijdrage van de zaadcel	vorming 1 pb	vorming 2 pb	eerste klevings- deling
<b>a. Apomiktische ontwikkelingen</b>			
1. haploïde parthenogenese	normaal	normaal	normaal
2. diploïde parthenogenese	normaal	normaal	onderdrukt
3. diploïde parthenogenese	normaal	onderdrukt	normaal
4. tetraploïde parthenogenese	normaal	onderdrukt	onderdrukt
5. diploïde parthenogenese	onderdrukt	normaal	normaal
6. tetraploïde parthenogenese	onderdrukt	normaal	onderdrukt
7. tetraploïde parthenogenese	onderdrukt	onderdrukt	normaal
8. octaploïde parthenogenese	onderdrukt	onderdrukt	onderdrukt
<b>b. Amphimiktische ontwikkelingen</b>			
1. (normale) diploïde ontwikkeling	normaal	normaal	normaal
2. tetraploïde ontwikkeling	normaal	normaal	onderdrukt
3. tetraploïde ontwikkeling	normaal	onderdrukt	normaal
4. hexaploïde ontwikkeling	normaal	onderdrukt	onderdrukt
5. triploïde ontwikkeling	onderdrukt	normaal	normaal
6. hexaploïde ontwikkeling	onderdrukt	normaal	onderdrukt
7. pentaploïde ontwikkeling	onderdrukt	onderdrukt	normaal
8. decaploïde ontwikkeling	onderdrukt	onderdrukt	onderdrukt
<b>c. Overige ontwikkelingen</b>			
1. ontwikkeling na polyspermie			
2. ontwikkeling na verlate bevruchting			
3. androgenese (ontwikkeling van een eicel onder invloed van het genetische materiaal van een zaadcel zonder genetische bijdrage van de kern van de eicel)			
4. ontwikkeling uit heteroploïde mannelijke geslachtsellen en een normale eicel			
5. ontwikkeling uit heteroploïde vrouwelijke geslachtsellen en een normale zaadcel			
6. aneuploïde ontwikkeling			
7. chromosomale mozaïeken			
8. chromosoom - verdubbeling in de tweede en latere klevingen van het ei. (kerndeling zonder celdeling).			
9. kerntransplantatie			
10. ontwikkeling na kruising tussen twee verschillende soorten			

Hoewel men bijna alle mogelijke ontwikkelingsvormen in deze klassifikatie kan onderbrengen laat de indeling door zijn onevenwichtigheid en beperkingen voor praktisch gebruik veel te wensen over. Een klassifikatie is per definitie slecht wanneer men een rubriek "overige mogelijkheden" opneemt en eveneens wanneer men na een grove verdeling onmiddellijk in zeer gedetailleerde groepen verder gaat onderverdelen. Een klassifikatie behoort stapsgewijs fijner en gedetailleerder van indeling te worden zodat een evenwichtige opbouw wordt verkregen. Men kan derhalve slechts tot de conclusie komen dat er geen goede, bruikbare indeling is waarin men alle bestaande vormen van natuurlijke of experimentele voortplanting bij gewervelde dieren kan onderbrengen. In de volgende paragraaf wordt daarom een nieuwe klassifikatie gegeven welke gekoppeld is aan duidelijke definities van bestaande en nieuwe begrippen.

### **1 – 3 Een nieuwe indeling van mogelijke ontwikkelingspatronen bij gewervelde dieren.**

Gewervelde dieren kunnen zich op twee wijzen voortplanten: geslachtelijk (zygogenese) en ongeslachtelijk (parthenogenese). In de normale geslachtelijke ontwikkeling vormen twee gedifferentieerde haploïde, geslachtscellen afkomstig van een mannelijk en vrouwelijk individu samen een diploïde zygote waaruit het embryo ontstaat. Onder ongeslachtelijke ontwikkeling kan men dus het tegendeel verstaan en wel de ontwikkeling van een embryo uit een vrouwelijke (of mannelijke) geslachtscel zonder de bijdrage van een geslachtscel van de andere sexe. Oorspronkelijk werd deze definitie dan ook gehanteerd. Dit vrij simpele onderscheid gaf echter moeilijkheden toen technieken ontwikkeld werden welke gynogenese of pseudogamie mogelijk maakte. Bij gynogenese gaat men uit van een normaal bevruchte eicel, echter met dien verstande dat de zaadcel langs natuurlijke weg geen genetische bijdrage kan leveren danwel door een bepaalde voorbehandeling genetisch geïnactiveerd is. (Hertwig, 1924; Dalcq, 1929; Thibault, 1949; Edwards, 1954 – B).

Het onderscheid tussen geslachtelijke en ongeslachtelijke voortplanting wordt nog complexer door recente toepassing van micro – chirurgische technieken waarmee men onder andere een pronucleus uit een bevruchte eicel kan verwijderen waarna de oorspronkelijke diploïde zygote zich verder kan ontwikkelen als een haploïde parthenogenont. (Modlinski, 1975). Recentelijk is men er tevens in geslaagd levende nakomelingen te krijgen uit muize – zygoten waarbij een van de twee pronuclei is verwijderd en na diploidisatie van de achtergebleven kern onder invloed van cytochalasine een diploïde blastocyst ontstond. Na transplantatie ontstonden 3 jonge homozygote muizen! (Hoppe & Illmensee, 1977) In dergelijke gevallen wordt het een arbitraire zaak om uit te maken of men nu van geslachtelijke of ongeslachtelijke ontwikkeling dient te spreken. Door deze nieuwe technieken zijn

als het ware mengvormen van kunstmatige en natuurlijke voortplantingsmechanismen ontstaan welke een eigen klassifikatie behoeven. Om deze reden wordt hier een nieuwe indeling gepostuleerd van mogelijke mechanismen bij de ontwikkeling van gewervelde dieren.

Alvorens we de vier hoofdpatronen gaan omschrijven dienen allereerst de volgende begrippen nader gedefinieerd te worden:

- **zygote** : de cel die ontstaat na de versmelting (in vivo of in vitro) van een volledig gedifferentieerde mannelijke en vrouwelijke geslachtscel.
- **embryo** : een jong ontwikkelingsstadium van zygogenese.
- **parthenogenoot** : een ontwikkelingsstadium of het eindresultaat van parthenogenese.

De vier hoofdpatronen welke onderscheiden kunnen worden, worden als volgt gedefinieerd:

## I. ZYGOGENESE

Een natuurlijke of experimentele ontwikkeling waarbij een gedifferentieerde mannelijke en vrouwelijke geslachtscel fuseren tot een zygote welke zich verder ontwikkelt. Via verschillende embryonale stadia ontstaat tenslotte een volwassen individu.

Zygoogenese kan onderverdeeld worden in zygogenese bij één – en bij tweeslachtige individuen. Bij de éénslachtige individuen vindt de "normale" bevruchting plaats; bij tweeslachtige individuen spreekt men over hermafroditisme. Hermafroditisme is het normaal en functioneel samengaan in een individu van mannelijke en vrouwelijke geslachtskenmerken. Onderscheid kan gemaakt worden tussen zelfbevruchting, kruisbevruchting en een combinatie van beide. Zo'n combinatie treft men bijvoorbeeld aan bij het voortplantingsmechanisme van de bladluis, *Icerya purchasi*. Deze plant zich normaal voort door middel van zelfbevruchting, doch is tevens in staat om te copuleren met zeldzaam voorkomende mannetjes welke uit eieren voortkomen die om onduidelijke redenen niet bevrucht zijn.

Bij hermafroditisme kan de rijping van de vrouwelijke en mannelijke geslachtscellen gelijktijdig (= functioneel hermafroditisme) of afwisselend optreden. In dit laatste geval kunnen in verschillende levensfasen eerst de mannelijke geslachtscellen (protandrisch) danwel de vrouwelijke geslachtscellen rijpen (protogyn).

## II. ZYGOPARTHENOGENESE

Een natuurlijke of experimentele ontwikkelingsvorm die begint als zygote doch waarbij tijdens de verdere ontwikkeling het genetisch materiaal van één van de ouders wordt geëlimineerd en uiteindelijk altijd slechts het genetisch materiaal van de andere ouder via de geslachtscellen aan de nakomelingen wordt doorgegeven. Afhankelijk van het feit of het genetisch materiaal van de vader of van de moeder wordt doorgegeven kunnen we spreken van respectievelijk mannelijke of vrouwelijke zygoparthenogenese.

Vrouwelijke zygoparthenogenese kan plaatsvinden doordat het genetisch materiaal van de mannelijke gameet reeds voor de bevruchting geïnactiveerd is (pre – inaktivatie) of doordat de genetische bijdrage van de mannelijke gameet geëlimineerd wordt nadat de bevruchting tot stand is gebracht (post – inaktivatie). Van mannelijke zygoparthenogenese kan gesproken worden doordat een zygote na verwijdering of inactivatie van het vrouwelijke genetisch materiaal zich verder ontwikkelt. Ook deze wijze van voortplanten kan men onderverdelen in pre – en post – inactivatie.

## III. PARTHENOZYGOGENESE

Een experimentele ontwikkelingsvorm waarin men bij een parthenogonot, door al dan niet experimenteel ingrijpen, genetisch materiaal van het andere geslacht introduceert met het oogmerk een verdere tweeslachtelijke ontwikkeling tot stand te brengen.

Parthenozygogenese kan ontstaan als gevolg van een vertraagde bevruchting, dat wil zeggen dat een zich reeds parthenogenetisch ontwikkelende eicel in vivo of in vitro wordt bevrucht en een verdere schijnbare zygo-genetische ontwikkeling plaatsvindt.

Ook kan parthenozygogenese ontstaan als gevolg van het experimenteel introduceren van mannelijk genetisch materiaal op een dusdanige wijze dat een genetische bijdrage wordt geleverd tot de verdere schijnbare zygo-genetische ontwikkeling.

## IV. PARTHENOGENESE

Een natuurlijke of experimentele verdere ontwikkeling van een gedifferentieerde geslachtscel buiten het orgaan dat deze geslachtscellen produceert en zonder enige bijdrage van het andere geslacht.

Bij een indeling van de verschillende typen parthenogenese moeten we ons realiseren dat er diverse indelingscriteria mogelijk zijn.

Een eenduidige indeling zonder elkaar overlappende gebieden is slechts te realiseren wanneer we ons tot één criterium beperken zoals bijvoorbeeld door Beatty (1957) die alleen drie cytologische variabelen hanteert.

Uit onderstaand overzicht blijkt dat er ook vele andere criteria mogelijk zijn:

- A. Cytologische variabelen :** Het al dan niet onderdrukken van:
1. de vorming van het eerste poollichaampje;
  2. de vorming van het tweede poollichaampje; en
  3. van de eerste klievingsdeling(en).
- B. Ploidie van de gevormde parthenogenont :**
1. haploïd;
  2. diploïd;
  3. heteroploïd;
  4. polyploïd.
- C. Plaats van ontwikkeling :**
1. ovariële (pre – ovulatoire) parthenogenese;
  2. extra ovariële (post – ovulatoire) parthenogenese.
- D. Geslachtsbepaling :**
1. uitsluitend mannelijke nakomelingen (*arrhenotoky*);
  2. uitsluitend vrouwelijke nakomelingen (*thelytoky*);
  3. zowel mannelijke als vrouwelijke nakomelingen (*deuterotoky*).
- E. Geografische verspreiding :**
1. algemeen geografisch verspreid;
  2. beperkt geografisch areaal.
- F. Eindstadium :**
1. compleet;
  2. incompleet, rudimentair.
- G. Ontstaanswijze :**
1. natuurlijk;
  2. experimenteel.
- H. Frequentie van optreden per individu :**
1. onbepaald (*tychoparthenogenese*);
  2. altijd.
- I. Frequentie van optreden in opeenvolgende generaties :**
1. constant, iedere generatie;
  2. cyclisch, één of meer parthenogenetische generaties wisselen af met een bisexuele generatie.

Door een zo groot mogelijk aantal criteria te hanteren kan men door deze te combineren tot een zeer duidelijke omschrijving komen van een bepaald type



parthenogenese, bijvoorbeeld facultatieve, incomplete, natuurlijke, post – ovulatoire, haploïde thelytoky.

Nadrukkelijk wordt in bovenstaande indeling en definities niet gesproken over een bepaald ontwikkelingsstadium dat tenminste bereikt zou moeten worden omdat dit niet van wezenlijke invloed is op deze klassificatie. Wel is rekening gehouden met mogelijke experimenten zoals bijvoorbeeld parthenozygogenese als gevolg van microchirurgische verwijdering van een pronucleus ( **Hoppe & Illmensee, 1977; 1982; Borsuk, 1982** ).

## HOOFDSTUK II

### NATUURLIJKE PARTHENOGENESE BIJ VERTEBRATEN, EEN LITERAATUURSTUDIE MET BIBLIOGRAFIE

#### II – 1 Inleiding

De eerste waarnemingen van natuurlijke parthenogenese bij gewervelde dieren dateren reeds uit 1827. In dat jaar publiceerden **Prévost en Dumas (1827)** de resultaten van hun studie naar veranderingen en ontwikkelingen in bevruchte en onbevruchte kippe – eieren. Soortgelijke waarnemingen bij **vogels** werden later gepubliceerd door **Coste (1849)**; **His (1868)** en **Oellacher (1872)**.

In dezelfde periode verschijnen ook publikaties over dit onderwerp bij de andere klassen der gewervelde dieren. Zo namen **Leukart (1853)** en **Dehner (1872)** delingen waar in onbevruchte kikker – eieren, dus bij **amfibieën**. Bij **vissen** werden de eerste waarnemingen door **Burnett (1857)** beschreven. Hij nam delingen waar in oöcyten van de kabeljauw. **Pflüger (1863)** beschreef het optreden van celdelingen in degenererende oöcyten van de **mens** en van **zoogdieren** terwijl **Hensen (1876)** drie eicellen met poollichaampjes beschreef in ovaria van de bruinvis.

Bij **reptielen** tenslotte dateren de eerste waarnemingen uit 1919 en 1935 ( **Schmidt, 1919**; **Smith, 1935** ).

Hoewel de eerste vermoedens over het optreden van natuurlijke parthenogenese dus al ruim een eeuw geleden zijn uitgesproken en er na de eerste publikaties een aanzienlijke uitbreiding van het aantal heeft plaats gevonden in de twintigste eeuw, heeft het onderwerp, de natuurlijke parthenogenese bij de gewervelde dieren, over het algemeen weinig bekendheid genoten.

Nog in 1950 werd door **Suomalaïnen (1950)** in een uitvoerig overzichtsartikel over parthenogenese bij dieren gesteld, dat "normale parthenogenese bij vertebraten niet bekend is". Toch waren er in de jaren dertig en veertig al diverse artikelen over dit onderwerp verschenen. Het feit, dat deze artikelen kennelijk in zo'n beperkte mate de aandacht hebben getrokken, is waarschijnlijk een van de redenen waarom er nog steeds geen overzichtsartikel over dit onderwerp is gepubliceerd. In dit hoofdstuk wordt in deze leemte voorzien. Achtereenvolgens zullen publikaties over natuurlijke parthenogenese bij vissen, amfibieën, reptielen, vogels en zoogdieren besproken worden, waarbij bepaalde families, waarover relatief veel gepubliceerd is, apart behandeld zullen worden.

## HOOFDSTUK II – 2

### NATUURLIJKE PARTHENOGENESE BIJ VISSEN

Reeds in 1857 werden door Burnett (1857) delingen in oöcyten in ovaria van de kabeljauw ( *Gadus morrhua* ) beschreven. Burnett concludeerde, dat delingen in oöcyten dus niet uitsluitend na een bevruchting optreden, maar ook spontaan kunnen plaatsvinden. Het is echter niet duidelijk in hoeverre er hier sprake was van het begin van een parthenogenetische ontwikkeling of slechts een waarneming van de eerste meiotische deling of van degeneratieve segmentatie.

Trifonowa (1931) laat er in haar beschrijving geen twijfel over bestaan in hoeverre er sprake is van parthenogenese. Haar artikel kan dan ook beschouwd worden als de eerste beschrijving van het optreden van natuurlijke parthenogenese bij vissen. Trifonowa (1931) baseerde haar conclusies op waarnemingen aan onbevruchte eieren van een zoetwatervis ( *Acerina cernua* ) en stelde onder andere vast, dat: "in vorliegenden Fälle aber haben wir es mit einer echten parthenogenetischen Entwicklung zu tun". Tevens neemt Trifonowa waar, dat bevruchte eicellen en parthenogenonten zich gedurende de eerste drie dagen van de ontwikkeling even snel delen, maar vanaf de vierde dag een vertraagde ontwikkeling vertonen. Parthenogenonten bleven tot 10 dagen na het begin van de ontwikkeling in leven (bij een normale embryonale ontwikkelingstijd van 15 dagen), waarbij werd aangetekend, dat de ontwikkeling tijdens de laatste dagen weinig vooruitgang boekte.

Drie jaar later komt Trifonowa (1934) uitgebreid op deze en nieuwe waarnemingen terug. Zij beschrijft dan tevens proeven bij verschillende soorten zoetwatervissen ( *Acerina cernua* ): de baars ( *Perca fluviatilis* ), de voorn ( *Rutilus rutilus* ) en de brasem ( *Abramis brama* ) met het doel om parthenogenese op experimentele wijze te induceren, onder andere door incubatie van eicellen in gedestilleerd water en door warmte. Op deze wijze werd een volledige parthenogenetische ontwikkeling verkregen waarbij de parthenogenonten zelfstandig uit het ei kwamen, doch daarna slechts kort in leven bleven. Opvallend was, dat de parthenogenonten tot aan het einde van hun ontwikkeling minder dan de helft van de eicel innamen en zich als dwerg ontwikkelden. Ook de ontwikkeling van de verschillende organen was abnormaal: "überhaupt die Entwicklung war deutlich pathologisch", aldus Trifonowa. Deze aanwijzingen voor een haploïde ontwikkeling worden versterkt door de waarneming, dat ook de kernen duidelijk kleiner zijn. Een jaar later slaagde Kasansky (1935) er als eerste in langs experimentele weg volwassen parthenogenetische vissen te kweken. Kasansky verkreeg deze ontwikkeling door de invloed van menselijk speeksel op eicellen van een wilde karper ( *Cyprinus carpio* ).

L.). Na Na incubatie gedurende 93 uur bij 18,7 – 22,5 graden Celsius nam hij een verdere ontwikkeling tot normaal uitziende jonge vissen waar. Tevens werden pogingen gedaan om karper – eicellen met sperma van de brasem (*Abramis brama* L.) te bevruchten. Er vond een normale embryonale ontwikkeling plaats, doch 5 – 16 dagen na het uitkomen van de larven gingen zij alle ten gronde.

Kennelijk is dit artikel van Kasansky pas veel later in grotere kring bekend geworden want zijn experimenten vormen het bewijs, dat een parthenogenetische ontwikkeling tot volwassen individuen bij vissen mogelijk is.

Pas na de eerste beschrijvingen van de langs experimentele weg verkregen eerste levende vissen parthenogenonten door Trifonowa (1931, 1934) verschijnen de eerste publikaties over waarnemingen omtrent de voortplanting bij vissen.

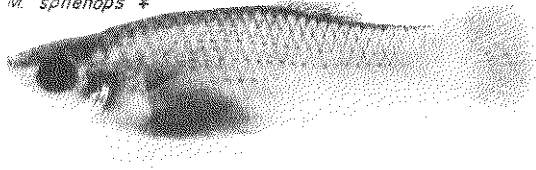
## II – 2.1 Cyprinidae

### II – 2.1.1 Poeciliae

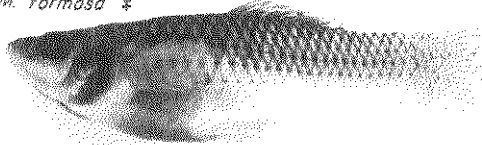
Zoals reeds in de inleiding werd vermeld is natuurlijke parthenogenese bij vissen het eerst beschreven door Trifonowa (1931). Dikwijls wordt deze primeur in de literatuur toegeschreven aan een artikel van Hubbs & Hubbs, dat een jaar later verscheen (1932). Daarin wordt de natuurlijke parthenogenese bij *Poecilia formosa* beschreven. Deze zeer veel voorkomende levendbarende cyprinodont van de familie der Poeciliae heeft zijn verspreidingsgebied tussen noord – oost Mexico en de zuidelijke punt van Texas. Lang werd verondersteld, dat het hier een aparte soort betrof, "*Mollienisia formosa*". In de literatuur wordt dan ook nog geruime tijd zowel de naam *Poecilia formosa* als *Mollienisia formosa* gebruikt voor dezelfde vissoort. Om verwarring te voorkomen zal in het vervolg echter steeds de juiste naam worden gebruikt: *Poecilia formosa* (Girard).

Hubbs & Hubbs (1932) vonden aanwijzingen, dat *Poecilia formosa* een hybride kon zijn tussen *Poecilia latipinna* en *Poecilia sphenops*. Deze twee soorten waren zo verschillend, dat ze lang in twee aparte genera geplaatst waren. Met behulp van een experimentele kruising tussen een *Poecilia sphenops* mannetje en een maagdelijk *Poecilia latipinna* vrouwtje werd de juistheid van bovengenoemde hypothese bewezen: de 22 nakomelingen waren alle hybriden en identiek aan *Poecilia formosa*. Opvallend was echter, dat *Poecilia formosa* in een groot gedeelte van het verspreidingsgebied uitsluitend als vrouwtje voorkwam. In dit gedeelte werd namelijk geen enkel mannetje aangetroffen tussen de ongeveer 2000 onderzochte exemplaren. Mannetjes werden slechts daar gevonden waar de beide "oudersoorten" samen voorkwamen. In die gedeelten van het verspreidingsgebied waar uitsluitend vrouwtjes voorkwamen vond men of de ene of de andere oudersoort in of vlakbij dat gebied. Toch zijn alle vrouwtjes, hoewel ze afkomstig

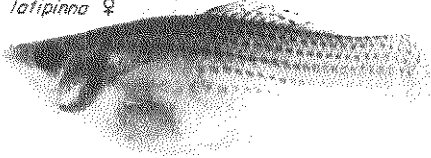
*M. sphenops* ♀



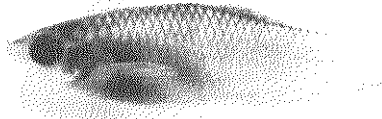
*M. formosa* ♀



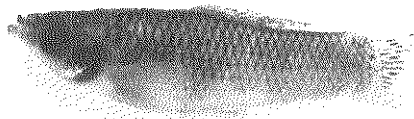
*M. latipinna* ♀



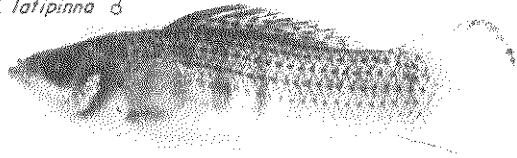
*M. sphenops* ♂



*M. formosa* ♂



*M. latipinna* ♂



Individuen van beide geslachten van *Mollienesia sphenops*, *Mollienesia formosa* en *Mollienesia latipinna*.  
(Uit: Hubbs et al., 1959).

kunnen zijn van kruisingen tussen *Poecilia formosa* met mannetjes van *Poecilia sphenops* of *Poecilia latipinna*, in bijna alle opzichten identiek. De kenmerken van de moeder worden als "blok" doorgegeven aan de nakomelingen. Op grond hiervan stellen Hubbs & Hubbs dan ook, dat "The consistent and abundant production of purely matroclinous en constantly female offspring by this hybrid form of fish finds its most plausible explanation as "parthenogenesis". It is apparently not a spontaneous parthenogenesis since many controls, unmated, have shown no indication of becoming pregnant. We provisionally assume that we are probably dealing with a case of gynogenesis". Met andere woorden, activatie van de eicellen door zaadcellen van een andere vissoort is nodig voor de parthenogenetische ontwikkeling.

Dat het hier een tamelijk progressieve hypothese betrof blijkt o.a. uit het nogal denigrerende commentaar van Howell (1933): "It is unwise to introduce the suggestion of parthenogenesis, even of a modified sort, into vertebrate literature. The phenomenon is so at variance with what is known and believed about vertebrate development that I am sure no vertebrate morphologist would admit for a moment that the natural development from an egg to sexual maturity of an individual vertebrate without the direct inclusion of the male element is within the realms of probability".

Gelukkig wordt de hypothese, dat het hier om gynogenese gaat, ook op meer wetenschappelijke wijze en minder emotioneel benaderd. Meyer (1938) constateert terecht, dat deze hypothese diverse alternatieven niet uitsluit en dat een cytologisch onderzoek geboden is. In zijn studie neemt hij, naast parthenogenese en gynogenese, ook andere mogelijkheden in overweging. Zo zouden de waarnemingen ook veroorzaakt kunnen worden door naar geslacht gedifferentieerde sterftcijfers of door de aanwezigheid van "een factor" welke zich gedurende de periode van geslachtsdifferentiatie manifesteert ten gunste van de ontwikkeling van vrouwtjes. Tevens probeert Meyer een verklaring te vinden met behulp van geslachtsgebonden erfelijkheidsstudies of door een ongewone verdeling te veronderstellen tijdens de eicelrijping van de chromosomen afkomstig van de vader en de moeder.

Evenals Hubbs & Hubbs toonde Meyer aan, dat parthenogenese in de strikte betekenis van het woord uitgesloten is. Bovendien toonde hij aan, dat de psychische invloed van de visuele aanwezigheid van het mannetje niet voldoende is voor het verkrijgen van nakomelingen: "The males exercise more than a psychic influence on mating". Op grond van de waargenomen gemiddelde grootte van kernen van somatische cellen van drie *Poecilia* – soorten sluit Meyer de mogelijkheid van een haploïd of polyploïd aantal chromosomen uit. Met behulp van de bestudering van microscopische preparaten van ovaria kon Meijer niet vaststellen in hoeverre de geheel vrouwelijke overerving van *Poecilia formosa* hybriden het resultaat is van een mogelijke eliminatie van het chromatine van de vader. Wel concludeert Meijer op grond van een genetische analyse, een histologische studie van het vrouwelijke

voortplantingssysteem en een studie van de vruchtbaarheid van *Poecilia*, dat de productie van uitsluitend vrouwtjes door *Poecilia formosa* niet veroorzaakt wordt door een eliminatie van de mannetjes in embryonale of volwassen stadia. Studies van de ontwikkeling van embryonale, jeugdige en volwassen ovaria van *Poecilia formosa* toonden voorts aan, dat de mogelijkheid van juveniel hermafroditisme uitgesloten moet worden. Concluderend acht Meijer het volgende mechanisme het meest waarschijnlijke voor het als blok overerven van alle vrouwelijke kenmerken: "Wanneer eicellen van *Poecilia formosa* bevrucht worden door zaadcellen van *Mollienisia sphenops* of *Poecilia latipinna* bevatten de daaruit resulterende embryo's zowel de chromosomen van de moeder als de vader. De chromosomen van de vader zijn echter niet in staat de aard van de nakomelingen te beïnvloeden in de aanwezigheid van vreemd cytoplasma en chromosomen van de moeder. Wanneer de eicellen van de hybride rijpen, vindt een selectieve meiose plaats waardoor al het chromatine van de vader in het poollichaampje wordt geëlimineerd". In 1946 (Hubbs & Hubbs, 1946) worden deze voorlopige conclusies bevestigd door 14 jaar experimenteel onderzoek. In deze periode werden 8.000 nakomelingen van 20 opeenvolgende generaties onderzocht. Alle bleken van het vrouwelijk geslacht te zijn en bovendien werd geen spoor van de genetische kenmerken van de vader teruggevonden. Wel werd gevonden, dat het aantal nakomelingen een evenredigheid vertoonde met de graad van verwantschap van de 50 typen mannelijke POECILIAE (species, sub-species, rassen en hybriden), welke getest werden. Zonder de aanwezigheid van een van deze typen mannetjes werden geen nakomelingen verkregen. Hoewel men als meest waarschijnlijke verklaring voor het genetische gedrag van *Poecilia formosa* de permanent gefixeerde diploidie geeft, is deze hypothese niet getest door cytologische studies van de oögenese.

Hubbs et al. (1959) maakten melding van de vangst van 1.150 *Poecilia* vissen, waarvan er naast 1.108 vrouwtjes *P. formosa*, 30 vrouwtjes en 11 mannetjes *P. latipinna* ook een fenotype *P. formosa* mannetje was. Op grond van vergelijkende fenotypische studies komt men tot de hypothese, dat dit mannetje ontstaan is als hybride tussen *P. sphenops* en *P. latipinna*. Microscopische studies toonden de aanwezigheid van testes aan; kruisingen met dit exemplaar waren helaas niet meer mogelijk doordat het mannetje "in het veld" reeds was gepreserveerd. Later wordt door Hubbs (1964) nogmaals melding gemaakt van "occasional males".

Experimenteel verkregen Haskins et al. (1960) fenotypische *Poecilia formosa* mannetjes door toevoeging van methyltestosteron (uiteindelijke concentratie: 3,5 ng/ml) aan aquaria met opgroeiende jonge *Poecilia formosa* vrouwtjes. Hiermede werd bewezen, dat de genetische informatie voor de expressie van secundaire mannelijke geslachtskenmerken nog intact was gebleven in die populatie.

Een verrassend resultaat werd verkregen uit kruisingen tussen *Poecilia formosa* vrouwtjes en *Limia vittata* mannetjes: de F-1 van 5 kruisingen was fenotypisch identiek aan *Limia vittata* en bestond overwegend uit mannetjes. Uit

terugkruisingsexperimenten bleken zowel de vrouwtjes als de mannetjes volledig fertil. Ook werden de F-1 mannetjes teruggekruist met *Poecilia formosa* vrouwtjes. Het resultaat was een gemengd broedsel, dat klaarblijkelijk was ontstaan als gevolg van een competitie tussen sexuele en gynogenetische voortplanting in een door sperma van een enkel mannetje bevruchte serie eicellen. In een eerste generatie van een dergelijke kruising overheerste de gynogenese, doch nadat de groep gedurende verscheidene maanden in grote vijvers had vertoefd had de sexuele voortplanting de gynogenese grotendeels verdrongen.

De hypothese van Hubbs (1955), die gynogenese als wijze van voortplanten bij *Poecilia formosa* veronderstelt, is door Kallman (1962) getest met behulp van weefseltransplantaties. Deze test was gebaseerd op het feit, dat weefseltransplantaties alleen dan succesvol zijn indien alle isoantigenen van de donor ook in de cellen van de ontvanger aanwezig zijn. Alle transplantaties waren succesvol in die gevallen, waarin de donor en de recipient van dezelfde "kloon" afkomstig waren; afstoting trad op indien dit niet het geval was. Op grond van deze experimenten, die eerder reeds door Spurway (1955) en Haldane (1958, 1959) waren gesuggereerd, acht Kallman gynogenese en het bestaan van verschillende klonen bewezen.

Kallman (1962 - B) onderzocht tevens het aantal klonen, dat een natuurlijke populatie vormt en de stabiliteit van deze klonen in tijd. Hij vond, dat circa 80% van de vissen tot slechts twee klonen behoorde; een derde kloon bestond uit 10% van de vissen. Bovendien vond hij, dat de populatie - opbouw gedurende tenminste negen jaren constant gebleven was, en waarschijnlijk reeds gedurende een veel langere periode. Deze conclusies worden bevestigd door Darnell et al. (1967), die soortgelijke studies verrichtten met vissen uit een ander gedeelte van het verspreidingsgebied (Rio Guayalejo - gebied) dan de door Kallman gebruikte vissen (Rio Grande gebied). Wel doen de resultaten van Darnell et al. vermoeden, dat de genetische overeenkomst tussen de verschillende Rio Guayalejo klonen kleiner zijn dan die tussen de Rio Grande klonen. Soortgelijke transplantatie - studies met de zeer zelden voorkomende hybride nakomelingen, die ook kenmerken van de vader vertonen (P.f. x P.s. hybriden en P.f. x P.v. hybriden), doen Kallman (1964) vermoeden, dat de *P. formosa* klonen homozygoot zijn. Hij veronderstelt dat diploidie hersteld wordt als resultaat van een fusie van de haploïde oöcyt - kern met het tweede poollichaampje of door onderdrukking van de eerste klievingsdeling.

Een volgende studie door Rasch et al. (1965) toont echter aan, dat de conclusie ten aanzien van "de vermoede homozygotie" van de *P. formosa* klonen niet de enig juiste behoefte te zijn. Met behulp van DNA metingen werd namelijk diploidie aangetoond in de tweeslachtige *P. sphenops* en de éénslachtige gynogenetische *P. formosa*, terwijl in de somatische kernen van eerdergenoemde twee typen hybriden triploidie werd aangetoond. Deze hybriden waren steriel, vertoonden tijdens



metafase I van de spermatogenese veel chromosomale afwijkingen en bezaten zowel "reuze – als microspermatiden" in de testis. Met deze studie werd eveneens voor het eerst bewezen, dat triploïde vertebraten door hybridisatie verkregen kunnen worden. Naast deze DNA metingen werd de triploïdie bij deze zeldzame hybriden ook nog bevestigd door middel van chromosoomtellingen (Schultz & Kallman, 1968).

Soortgelijke resultaten werden door Rasch et al. (1970) verkregen. In een omvangrijke, 5 jaren durende, studie werd met behulp van cytofotometrische analyses van DNA – gehalten en daarmee verband houdende studies van karyotypen duidelijk vastgesteld, dat niet alleen in de laboratoriumkweeken, maar ook in de natuur, spontane triploïde *Poeciliae* gevormd werden. Bovendien werd bij de triploïde hybriden een belangrijke toename in celgrootte en DNA – gehalte bij erythrocyten vastgesteld, waardoor deze hybriden zich duidelijk onderscheidden van de verschillende diploïde soorten (vormen). Eerder had Rash (1968) reeds een verhoogd erythrocyten DNA – gehalte vastgesteld bij 4 a – typische *P. formosa* exemplaren. Het hybride karakter van deze exemplaren werd bevestigd door elektroforese – studies van bloedserum eiwitten. Alle vier exemplaren vertoonden a – typische albumine – banden, die karakteristiek waren voor de participerende vader species en duidelijk te onderscheiden waren van de typische *P. formosa* exemplaren .

Darnell & Abramoff (1968) proberen het oorspronkelijke verspreidingspatroon van de *Poecilia* – soorten ( *P. latipinna* , *P. sphenops* , *P. mexicana* en *P. formosa* ) te verklaren op basis van tegenwoordige biologische en geografische factoren. Zij tonen aan, dat *P. formosa* relatief kort geleden is ontstaan in kustlagunes van waaruit de soort zich langs de kust en stroomopwaarts verspreidde. Zeer terloops wordt tevens melding gemaakt van "a functional male derived from a *P. formosa* mother" , waardoor het bestaan van mannetjes binnen de species is komen vast te staan. De meeste fenotypische mannetjes waren niet "functioneel" (onder andere steriel), hetgeen het sterke vermoeden doet rijzen, dat het genetische abnormaliteiten waren (Rasch et al., 1965) of genotypische vrouwtjes, die door exceptionele milieu – of interne factoren mannelijke kenmerken ontwikkelden.

Met cytogenetische studies tonen Prehn & Rash (1969) het bestaan aan van een natuurlijke triploïde kloon van *P. formosa* . De uitwendige morfologie lijkt sterk op de sympatrische *P. mexicana* . Op grond van de aantallen en vormen chromosomen wordt geconcludeerd, dat deze triploïde *P. formosa* individuen de diploïde chromosoomset van de moeder bezitten ( *P. formosa* ) en een haploïde set chromosomen van de vader ( *P. mexicana* ).

Abramoff et al. (1968) verrichtten elektroforese – onderzoek aan serum – eiwitten van het bloed van *P. formosa* , *P. latipinna* en *P. mexicana* . Het bleek, dat de op 33 verschillende plaatsen in de natuur gevangen *P. formosa* twee albuminebanden

bezat, welke identiek waren aan banden, die de in het laboratorium verkregen hybriden van *P. latipinna* en *P. mexicana* vertoonden. De veronderstelde oudersoorten *P. latipinna* en *P. mexicana* bezaten ieder één albumineband met verschillende elektro – foretische mobiliteit. Studies met gemengde sera toonden de elektro – foretische overeenkomst aan tussen de twee *P. formosa* banden met die van de twee veronderstelde oudersoort *P. latipinna* en *P. mexicana* en bevestigden daarmee de conclusie, dat *P. formosa* oorspronkelijk door hybridisatie van *P. latipinna* en *P. mexicana* is ontstaan. Mede op grond van deze resultaten worden de eerder gesuggereerde mechanismen, welke de ploëdie bij gynogenese in stand houden, verworpen en geeft men de voorkeur aan de door MacGregor & Uzzell (1964) gepostuleerde hypothese, die gebaseerd is op pre – meiotische endoreplicatie gedurende de oögenese. Het uiteindelijke bewijs zal echter geleverd moeten worden aan de hand van kritische cytologische studies van de meiose in zowel diploïde als triploïde vissen. Pas dan zou het juiste genetische mechanisme vastgesteld kunnen worden.

Door Rasch & Balsano (1974) wordt een grote spreiding in natuurlijke populaties van het percentage triploïde *Poecilia* vrouwtjes waargenomen, zowel van jaar tot jaar en seizoenen tot seizoenen als van plaats tot plaats in de natuur. In laboratoriumkweken werd tevens vastgesteld, dat de in het wild gevangen triploïde vrouwtjes in staat zijn zich op gynogenetische wijze voort te planten, waarbij het triploïde genoom in zijn geheel wordt doorgegeven aan de éénslachtige nakomelingen. Dit laatste werd aangetoond met behulp van elektroforese studies aan bloedplasma en DNA cytofotometrische bepalingen van Feulgen – gekleurde kernen en bloedcellen.

Vanwege hun bijzondere wijze van voortplanten bevelen Setlow et al. (1978) *Poecilia* vissen als model aan voor de studie van in vivo effecten van biologische schade aan DNA als gevolg van ioniserende straling. Gesuggereerd wordt, dat het model gebruikt kan worden om informatie te verkrijgen omtrent de moleculaire effecten van schadelijke invloeden op dieren. Cellen van specifieke weefsels kunnen goed gedefiniëerd "behandeld" worden; de schade gemeten en de lesies in vivo onderzocht. De genetische homogeniteit van de klonen garandeert een minimale variatie in de individuele reacties terwijl de proeven in zeer sterke mate reproduceerbaar zijn. Daarom zal een beperkt aantal vissen voldoende zijn om statistisch verantwoorde resultaten te verkrijgen.

In navolging van de synthese van een éénslachtige *Poeciliopsis* in het laboratorium door Schultz (1973) proberen Turner et al. (1980) op eenzelfde wijze gynogenetische *Poecilia formosa* klonen te kweken. Daartoe werden 337 *Poeciliae latipinna* x *P. mexicana* (beide reciproken) en 83 *Poeciliae latipinna* x *Poeciliae sphenops* hybriden in het laboratorium gekweekt. Hoewel dit de veronderstelde oudersoorten van *Poecilia formosa* zijn, bleken er zich geen gynogenonten tussen de F – 1 hybride

wijfjes te bevinden. Turner et al. verklaren dit onverwachte resultaat met een van de twee volgende veronderstellingen: —

- (1) tenminste een van de oudersoorten is ten onrechte als zodanig geïdentificeerd en
- (2) er zijn speciale "gynogenetische genotypen" tussen de genomen van tenminste een van de oudersoorten, die resulteren in gynogenese na hybridisatie. De frequentie van deze genotypen zou geografisch en mogelijk in de tijd variëren. Zij zouden zeldzaam of afwezig zijn in de door Turner en medewerkers gebruikte populaties.

Indien deze laatste hypothese juist is volgt daaruit, dat de verschillen tussen wel — of niet gynogenetische genotypen waarschijnlijk slechts gering zijn en, in het extreme geval, mogelijk slechts betrekking hebben op verschillende allelen in maar één locus. De oorsprong van parthenogenese in *Poecilia formosa*, maar mogelijk ook bij andere éénslachtige dieren, zou dan niet berusten op een totale interactie tussen twee verschillende componenten van een hybride genoom, maar in de aktie van bepaalde allelen op één of een paar loci, die door hybridisatie in een nieuwe genetische omgeving zijn geplaatst.

## II — 2.1.2. *Poeciliopsis*

In 1959 beschrijven Miller & Schultz (1959) de ontdekking van éénslachtige typen in twee soorten, welke deel uitmaken van dezelfde familie waartoe de POECILIAE behoren, namelijk de CYPRINIIDAE. Beide soorten behoren tot hetzelfde genus. Deze rassen komen voor in de rivieren bij de kust van noord — west Mexico en worden aangeduid met *Poeciliopsis F.* en *Poeciliopsis C.* Bij deze twee soorten komen — in tegenstelling tot *Poecilia formosa* — twee typen vrouwtjes voor: exemplaren, die beide geslachten voortbrengen en exemplaren, die — hoewel gekruist met hetzelfde mannetje — uitsluitend dochters voortbrengen. Tevens erven de jongen van de uitsluitend uit vrouwtjes bestaande typen wel de karakteristieken van de verschillende, in experimentele kruisingen gebruikte, mannetjes. De éénslachtige typen van de beide *Poeciliopsis* soorten vormen mogelijk een overgangsstadium in de ontwikkeling van een uitsluitend vrouwelijke vorm zoals bij *Poecilia formosa*.

Het doel van de daaropvolgende onderzoeken van Schultz (1961, 1966, 1967 en 1969) is na te gaan wat het geslachtsbepalende mechanisme is, dat verantwoordelijk is voor de éénslachtigheid in *Poeciliopsis* (Schultz, 1961). De volgende mogelijkheden zijn door Schultz overwogen: een lethaal principe, polyploidie, parthenogenese, gynogenese, geslachtsverandering, cytoplasmatische erfelijkheid, onevenwichtig autosomaal genoom en selectieve rijping. Vele van deze mogelijkheden waren ook reeds door Meijer (1938) geopperd en onderzocht.

Onderzoek aan de ovaria en broedgegevens sluiten de mogelijkheid uit, dat het ontbreken van mannetjes in het nageslacht veroorzaakt wordt door lethale factoren. Blijkens genetische en histologische gegevens van de gonaden is ook geslachtsverandering uitgesloten. Overerving van kenmerken van de vader door het éénslachtige type nageslacht bewijst, dat parthe- en gynogenese onmogelijk is, terwijl polyploidie blijkens chromosoomtellingen ook niet optreedt. Eveneens was er geen genetisch of cytologisch bewijs, dat de tweeslachtige rassen geslachts - chromosomen bezitten.

Het blijkt, dat geslachtsbepaling grotendeels - zo niet geheel - bepaald wordt door autosomale genen. Overerving van een marker - gen ("dorsal fin spot") in zowel de één - als tweeslachtige rassen in de verschillende kruisingen duidt erop, dat het mannelijk chromosoom met het "S" locus niet doorgegeven wordt aan het ei, doch gedurende de oögenese verloren gaat, aldus Schultz (1961). Hij postuleert het volgende mechanisme: "The non - homologous or "W" chromosome of "C" and "F" is in reality not a sex chromosome, but rather one of several chromosomes introduced into the genomes of the unisexual females through hybridisation. These chromosomes, which are inherited as a unit, have female - determining factors too strong to be counterbalanced by the paternal factors provided by "C" or "F" males. They furthermore are genetically too dissimilar to pair with the paternal chromosomes during oögenesis. Synapsis probably results in the expulsion of the paternal chromosomes in a polar body". In hoeverre Schultz bewust of "onbewust" nalaat Meijer (1938) te citeren is niet duidelijk. Het is echter opvallend, dat er zoveel gelijke gedachten en conclusies in beide artikelen voorkomen.

Inmiddels is, op grond van de grote morfologische uniformiteit, *Poeciliopsis Cx* door Miller (1960) als *Poeciliopsis lucida* geïdentificeerd, terwijl *Poeciliopsis F.* nog steeds niet nader is beschreven.

Schultz toetst de door hem geopperde hypothese met behulp van hybridisatie - experimenten (Schultz, 1966). In de vorige studie (Schultz, 1961) was slechts één marker - gen beschikbaar om het lot van de chromosomen van de vader te vervolgen. Hierdoor kon derhalve niet met zekerheid bewezen worden, dat er steeds meer dan één chromosoom van de vader verloren ging tijdens de oögenese van de eerste generatie. Door het grote aantal kenmerken, waardoor *Poeciliopsis latidens* verschilt van *Poeciliopsis Cx* en *Poeciliopsis lucida* is het echter wel mogelijk na te gaan in hoeverre meerdere chromosomen van de vader doorgegeven worden in de eicellen van de verschillende hybride kruisingen. Van de 14 *Poeciliopsis* soorten, die voor de hybridisatie - experimenten werden gebruikt, gaven 10 soorten fertiel nageslacht na kruising met *Poeciliopsis Cx*. In alle kruisingen vertoonde het verkregen nageslacht kenmerken van zowel de vader als de moeder, zodat zij dus als werkelijke hybriden en niet als produkten van parthenogenese of gynogenese beschouwd moeten worden. Op grond van terugkruisings - experimenten wordt echter geconcludeerd, dat geen enkel chromosoom van de *Poeciliopsis latidens*

vader doorgegeven wordt via de eicellen. Alle gingen waarschijnlijk gedurende de oögenese verloren! "We deal thus with an isolating mechanism that is complete. There is little likelihood that wild populations of Cx are genetically altered by either lucida or latidens, but that the male genome is only borrowed for the production of each generation".

Een jaar later concludeert Schultz (1967) op grond van andere hybridisatieexperimenten, dat er tenminste drie op elkaar gelijkende, maar toch verschillende, uitsluitend vrouwelijke rassen zijn, die door hem met Cx, Cy en Cz worden aangeduid. Aanvankelijk werden de Cy en Cz rassen niet als zodanig onderscheiden, maar beide als Cx beschouwd doordat zij in het laboratorium uitsluitend in stand gehouden werden door kruisingen met *Poeciliopsis lucida* mannetjes. Toen zij echter ook met *Poeciliopsis latidens* mannetjes gekruist werden bleken aanzienlijke verschillen in het nageslacht op te treden. In plaats van beide geslachten, bracht Cz namelijk alleen mannetjes voort. Het voortplantingsmechanisme, dat resulteert in dit volkomen mannelijke nageslacht, is nog niet duidelijk. De derde vorm, Cy, bracht na kruising met *Poeciliopsis latidens* mannetjes alleen vrouwtjes voort, die morfologisch niet van de moeder waren te onderscheiden. Het blijvend achterwege blijven van de expressie van *Poeciliopsis latidens* kenmerken in deze nakomelingen doet vermoeden, dat Cy zich gynogenetisch voortplant. Wat betreft het voortplantingsmechanisme lijkt Cy dus sterk op *Poecilia formosa* (Hubbs & Hubbs, 1932). Bovendien bleek Cy – in tegenstelling tot de diploïde rassen Cx en Cz – triploïd te zijn: "Suppression of a cleavage stage and the production of diploid eggs, followed by fertilisation with *Poeciliopsis lucida* sperm, is the most likely origin of the triploid Cy. Once the triploid chromosome complement is acquired, meiosis is probably preceded by endomitosis, the population henceforth being sustained by gynogenesis from triploid eggs". Deze verklaring is dezelfde als die, welke door Uzzell & Goldblatt (1967) naar voren is gebracht om het ontstaan van de triploïde *Ambystoma* te verklaren (zie Hoofdstuk II-3). Met dien verstande, dat in het geval van de *Poeciliopsis* de intermediaire hybride nog aanwezig is in de vorm van het geheel uit vrouwtjes bestaande diploïde ras. In 1969 beschrijft Schultz de ontdekking van een tweede triploïde gynogenetische *Poeciliopsis* soort naast het reeds eerder beschreven "Cy" type (Schultz, 1967). Het "poeciliopsis complex" bestaat dus nu uit twee tweeslachtige soorten (*Poeciliopsis monacha* en *Poeciliopsis lucida*) en drie éénslachtige, hiervan afgeleide soorten, waarvan er twee triploïd zijn en de derde diploïd. De "diploïde" (2n) hybride bestaat uit 1n van *Poeciliopsis monacha* en 1n van *Poeciliopsis lucida*. Gedurende de oögenese in deze hybride gaan de, van de vader afkomstige, *P. lucida* chromosomen verloren, zodat de *Poeciliopsis monacha* set aan de eicellen wordt doorgegeven. Doordat de hybride in hoofdzaak met *Poeciliopsis lucida* kruist blijft het hybride karakter toch gehandhaafd. Deze wijze van voortplanten wordt door Schultz "hybridogenese" genoemd: "Each individual originates as a hybrid". Door incidentele afwijkingen in deze hybridogenese ontstaan soms ook 2n. Wanneer deze eicellen door zaadcellen van achtereenvolgens

*Poeciliopsis lucida* en *Poeciliopsis monacha* worden bevrucht, ontstaan twee triploïde – eveneens éénslachtige – soorten, respectievelijk *Poeciliopsis 1 – monacha/2 – lucida* en *Poeciliopsis 2 – monacha/1 – lucida*. Een jaar later melden Cimino & Schultz (1970) de produktie van diploïde mannelijk nageslacht van een triploïde gynogenetische *Poeciliopsis* soort. In het broedsel van negen uit de natuur afkomstige triploïde *Poeciliopsis 2 – monacha/1 – lucida* vrouwtjes, die in het laboratorium met *Poeciliopsis monacha* gekruist waren, werden totaal 332 triploïde vrouwtjes geïdentificeerd, welke alle morfologisch identiek waren aan hun moeders. Er werd echter ook één mannetje geboren in een broedsel met verder nog 23 vrouwtjes. Chromosoomtellingen wezen uit, dat de moeder en de nakomelingen triploïd waren (72 chromosomen), terwijl het mannetje diploïd bleek te zijn (48 chromosomen). Hoewel Cimino & Schultz de mogelijke invloed van een milieufactor als oorzaak van het afbreken van het normale gynogenetische patroon niet uitsluiten, achten zij van groot belang, dat met deze waarnemingen is aangetoond, dat triploïdie geen evolutionair eindpunt behoeft te zijn!

In latere studies (Moore et al., 1970; Schultz, 1971) probeert men – door bestudering van verspreidingspatronen, geografie en mogelijke problemen van aanpassing aan het milieu – het ontstaan van de éénslachtige hybridogenetische vormen van *Poeciliopsis* te verklaren.

Cimino (1971, 1972 – A, 1972 – B) verrichtte onderzoek naar de meiose en de cytogenetica van het één – tweeslachtige *Poeciliopsis* complex. Door microscopisch onderzoek van ovaria ontdekte hij een bij vertebraten nog niet eerder waargenomen mechanisme voor de oögenese van de diploïde gynogenonten. Cimino duidt dit mechanisme aan met "premeiotic exclusion". Tijdens de laatste mitose, die aan de meiose vooraf gaat, rangschikken de chromosomen van de moeder zich in het equatoriale vlak van een éénpolige kernspoel en begeven zich naar de pool. De chromosomen van de vader associëren zich niet met de spoel, maar blijven verspreid in het cytoplasma om vervolgens aan de tegenoverliggende plaats samen te klonteren. De celdeling wordt onderdrukt, zodat er een oögonium ontstaat met twee clusters chromosomen, beide in verschillende mate gecontraheerd. Op deze wijze bevat de kern van het oögonium uitsluitend de chromosomen van de moeder. De meiose begint vervolgens met een "normale" profase I. Paring van de homologe chromosomen kan uiteraard niet plaatsvinden. Na de overlangse scheiding van de chromosomen, die van de moeder afkomstig zijn, wordt een haploïd poollichaampje afgestoten en ontstaat dus een haploïde eicel. De chromosomen van de vader worden vervolgens geresorbeerd en desintegreren in het oöplasma of worden afgestoten. Op basis van dit mechanisme geeft Cimino (1972 – B) een mogelijke verklaring voor het ontstaan van de natuurlijke triploïdie in *Poeciliopsis*. Onderdrukking van de eerste meiotische deling ten gevolge van abrupte temperatuurstijging op het juiste moment in de oögenese zou in een diploïde eicel kunnen resulteren, waardoor er na bevruchting met een haploïde zaadcel een triploïde vis kan ontstaan. De warmte – schok kan verklaard worden door de grote

temperatuurverschillen, welke in de natuurlijke vindplaatsen van de vissen voorkomen. Sommige rivieren worden onder andere gevoed door warmwaterbronnen van 44 graden Celsius. Op plaatsen waar dit water uitkomt in een rivier, waarvan het water 27 graden Celsius is, komen dus grote en vrij extreme temperatuurverschillen voor, waaraan de vissen uiteraard zijn blootgesteld. Dat deze temperatuurswisselingen bij vissen de plooidie kunnen beïnvloeden was reeds eerder bekend uit experimenteel werk (Swamp, 1959; Makino & Ozima, 1943).

Vrijenhoek (1972) bestudeerde de genetische relaties tussen éénslachtige hybride *Poeciliopsis* soorten en hun voorouders met behulp van het voorkomen van lactaatdehydrogenase iso – enzymen als genetische kenmerken. Elektroforese van extracten van oogweefsel toonde genetische verschillen aan ten aanzien van de lactaatdehydrogenase locus. Deze verschillen werden als waardevolle, eenvoudige genetische kenmerken gebruikt om de hypothese te testen inzake de veronderstelde hybride oorsprong van deze éénslachtige vissen. De resultaten toonden de verschillen aan in de genetische bijdragen van de voorouders en ondersteunden de hypothese ten aanzien van de hybride oorsprong. Eenzelfde type onderzoek werd later door Vrijenhoek (1975) beschreven. Daarin werden elektroforese – studies verricht aan een spier – eiwit (MP-1) en aan iso – enzymen van alcohol – dehydrogenase (ADH) en werden waarnemingen gedaan, die overeenkwamen met de bovengenoemde resultaten (Vrijenhoek, 1972).

Inmiddels was door Schultz (1973) op experimentele wijze de juistheid van de hypothese over de hybride oorsprong van deze vissen aangetoond. Schultz (1973) meldt de "synthese van een species" in het laboratorium. Meer dan 67 kruisingen tussen *Poeciliopsis monacha* en *Poeciliopsis lucida* waren seder 1957 uitgevoerd; vijf daarvan waren succesvol in die zin, dat fertiele nakomelingen werden verkregen. De problemen bij deze kruising ontstonden vooral door het verschil in grootte tussen het hybride embryo en de verhoudingsgewijs te grote *Poeciliopsis monacha* dooier. Hierdoor ontstonden ontwikkelingsafwijkingen ten gevolge van het niet – tijdig gebruiken – en dus verdwijnen – van de dooier. Is echter een kruising gelukt, dan hebben de volgende generaties deze problemen niet meer omdat zij zich in "middelgrote" eieren ontwikkelen (de diameters van de eieren zijn resp.: *Poeciliopsis monacha* 2,2 mm ; *Poeciliopsis lucida* 1,4 mm en *Poeciliopsis monacha x lucida* 1,8 mm!).

Thibault (1974) concludeerde, dat de belangrijkste factor in de verdeling van de drie eenslachtige *Poeciliopsis* soorten bepaald wordt door de aanpassing aan het ecologische midden van dat van de beide oudersoorten.

Uzzell & Darevsky (1975) kwamen tot dezelfde conclusie na bestudering van hagedissen aan de hand van de verspreiding van de éénslachtige soorten van het *Lacerta saxicola* complex. Met name werden intermediaire waarden gevonden

tussen de oudersoorten ten aanzien van de hoogte ten opzichte van het zeeniveau, de geografische en de vegetatieve aspecten van het natuurlijke milieu.

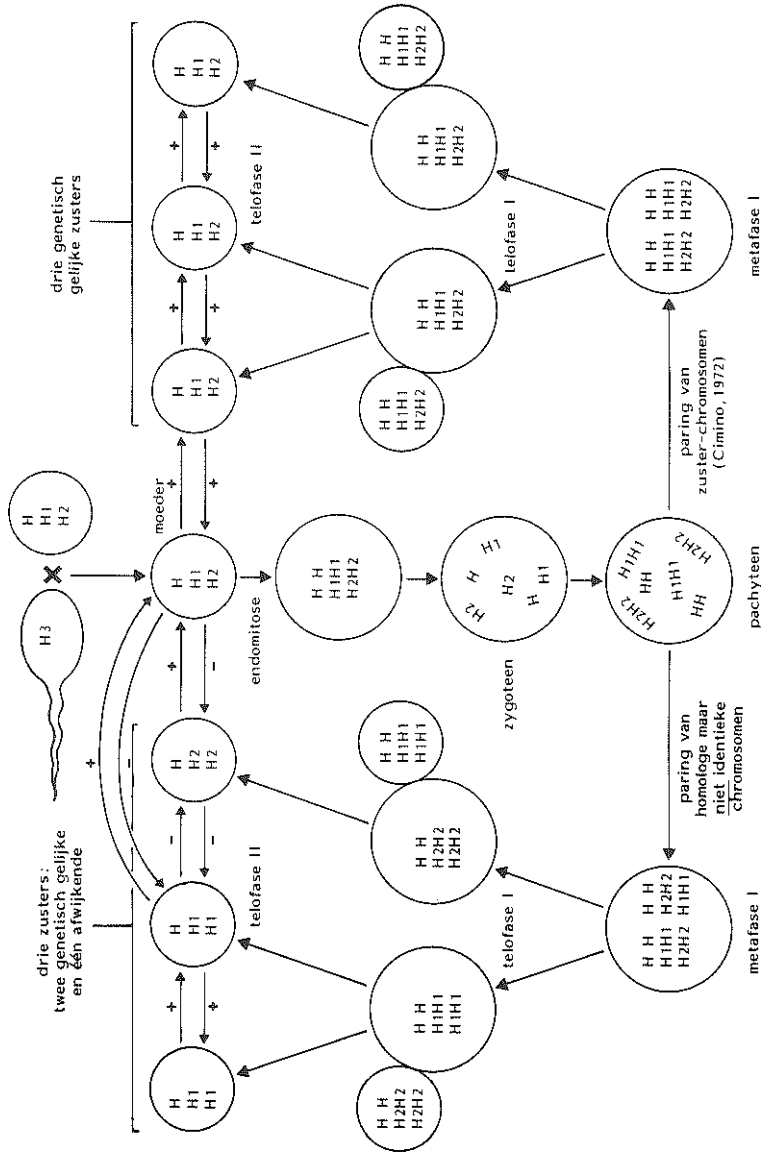
Moore (1976) geeft een analyse van de geografische verspreiding van *Poeciliopsis monacha-occidentalis*. Hij plaatst deze analyse in de context van een mathematisch selectiemodel, waarin de eenslachtige voortplanting in drie verschillende componenten wordt verdeeld: de waarschijnlijkheid, dat een vrouwtje zwanger is; de waarschijnlijkheid, dat een bepaald nageslacht vrouwelijk is, en de mate waarin een bepaald fenotype in staat is zich in een bepaalde omgeving te handhaven. Geconcludeerd wordt, dat heterozygotie en aanpassing aan verschillende niches weinig of geen bijdrage leveren tot de verspreiding van de geanalyseerde *Poeciliopsis*-soort, terwijl juist het voorkomen van ecologische overgangsgebieden de meest waarschijnlijke verklaring vormt voor de relatief hoge mate van succes waarmee de dieren zich handhaven.

Vrijenhoek et al. (1967, 1977) verzamelden in 5 geografisch gescheiden verspreidingsgebieden *Poeciliopsis occidentalis* en *Poeciliopsis monacha-occidentalis* ten behoeve van een vergelijkende studie van de genetische variabiliteit en heterozygotie bij deze twee soorten in deze gebieden. Elektroforese-studies werden uitgevoerd met extracten uit lever, ogen en spierweefsel. Totaal werd de variatie van 25 eiwit-loci bepaald. Zoals verwacht waren de verschillen bij de *Poeciliopsis monacha-occidentalis* veel groter dan bij die van *Poeciliopsis occidentalis*. Schultz (1977) publiceert een zeer goed overzichtsartikel over de evolutie en de ecologie van *Poeciliopsis*, waarin incidenteel ook vergelijkingen gemaakt worden met de andere éénslachtige soorten: de mollies (*Poecilia*) en de goudvissen (*Carassius*). Met name behandelt hij de volgende aspecten van de eenslachtige vissen: het ontstaan, de voortplantingsmechanismen, de geografische verspreiding, de hetero-zygotie en veelvormigheid binnen een populatie, competitieve aspecten met tweeslachtige soorten, competitieve aspecten tussen klonen van éénslachtige soorten en de voordelen van geslachtelijke voortplanting tegenover ongeslachtelijke voortplanting.

In hetzelfde jaar publiceert Moore (1977) een eerste van een voorgenomen serie artikelen met de bedoeling de genetische structuur, het aanpassingsverloop en de evolutionaire mogelijkheden te onderzoeken van *Poeciliopsis 2-monacha/1-lucida*. Het eerste onderzoek omvat weefseltransplantatiestudies met het doel drie hypothesen inzake de verschillende typen homologe chromosoomparing (zuster chromosoomparing, willekeurige paring van de *monacha* homologen en willekeurige paring van alle homologen (dus *2 monacha* en *1 lucida*) te testen en als vierde hypothese na te gaan of chromatine van de vader incidenteel in de zygote-kern wordt opgenomen. Figuur I is een afgeleid schema van een soortgelijke figuur van Moore (1977). Het geeft een hypothetisch verloop aan van de meiose ingeval zuster-chromosoomparing plaatsvindt en de consequenties voor de histocompatibiliteitsrelaties van de verschillende paringen van de *monacha*



FIGUUR I



Hypothetisch verloop van de meiose en de daaruit voortvloeiende consequenties voor de histocompatibiliteitsrelaties voor Poeciliopsis 2 monacha 1 lucida.

H: lucida histocompatibiliteitsgenen of chromosoom  
 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>: monacha homologen  
 + →: acceptatie, →: afstoting

homologen. Deze relaties werden onderzocht met behulp van weefseltransplanten. De resultaten werden getoetst aan de in het schema aangegeven te verwachten afstotingsreacties, respectievelijk acceptaties, van transplantaten. Op grond van de verkregen resultaten concludeert Moore, dat er sprake is van zuster – chromosoomparing; de andere hypothesen konden worden verworpen. Deze conclusie komt overeen met het reeds in 1972 door Cimino veronderstelde meiotische mechanisme ("pre – meiotic exclusion").

Vrijenhoek et al. (1978) voerden een genetische analyse uit van de populatiestructuur van *Poeciliopsis monacha-lucida*, waarbij met name bestudeerd werd hoeveel variatie er bestond, de oorzaken van deze variatie en het belang van de variatie in relatie tot het habitat. Alle onderzochte dieren waren afkomstig uit nakomelingen, die op vier verschillende lokaties in de natuur gevangen waren. Deze 37 vrouwtjes werden in het laboratorium met mannetjes van een ingeteelde *P. lucida* stam verder gekweekt. Individuele elektroforesepatronen van 12 eiwitten, die door totaal 22 loci gecodeerd werden, werden vergeleken. Uit de elektroforese – gegevens van deze 37 stammen konden acht verschillende haploïde, van de moeder afkomstige, genotypen worden onderscheiden, hetgeen op tenminste acht verschillende hemiklonen duidde.

### II – 2.1.3 Carassius

In een zeer korte mededeling rapporteert Lieder (1955) het ontbreken van mannetjes in een aantal onderzochte populaties van de zilverkarper, *Carassius auratus gibelio* (Bloch); waarschijnlijk de natuurlijke vorm van de goudvis (*Carassius auratus L.*). Mede op basis van laboratorium – experimenten komt Lieder tot de conclusie, dat "in der Regel keine normale Befruchtung statt findet, sondern die Eier sich auf einen "Entwicklungsanstoss" durch die Besamung hin parthenogenetisch entwickeln. Auf welcher Weise der Entwicklungsanstoss erfolgt und wie die Chromosomenzahl konstant gehalten wird, ist noch unbekannt und Gegenstand weiterer Untersuchungen." Later beschrijft Lieder (1959) de oögenese en bevruchting van *Carassius auratus gibelio* (Bloch). Het blijkt, dat de binnengedrongen zaadcel zich naar de kernspool begeeft, doch dat er geen pronucleusvorming en kernversmelting plaatsvindt. Wel schijnt het kerncentrosoom van de zaadcel aan de eikern afgegeven te worden want de tegen de kernmembraan liggende zaadcel verliest de "Plasmastrahlung" terwijl de eikern nu aan "beide" kanten "Strahlungsfiguren aufweist"!

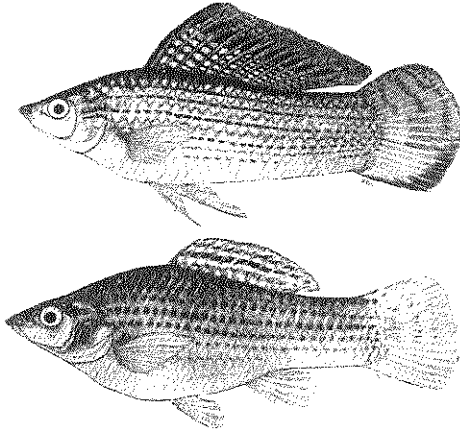
Ook door Busnita et al. (1955) wordt waargenomen, dat deze centrosoomoverdracht plaatsvindt alvorens de eerste klievingsdeling tot stand komt. Volgens Lieder (1959) is dit mogelijk de reden waarom bevruchting noodzakelijk is voordat een verdere gynogenetische ontwikkeling kan plaatsvinden. Hoewel Busnita et al (1957)

veronderstellen, dat er slechts één rijpingsdeling plaatsvindt omdat zij geen tweede poollichaampje konden waarnemen, wijst Lieder (1959) op het feit, dat de eerste rijpingsdeling reeds voor de ovulatie voltooid kan zijn en het daarbij afgesnoerde poollichaampje snel degenereert en dus later niet meer waarneembaar is. Merkwaardig genoeg geeft Lieder echter geen verklaring op welke wijze het chromosoom – aantal dan wel constant kan blijven. Wel stelt hij om onduidelijke redenen "eine Rückwanderung des Polkörper auszuschiessen". Op grond van schattingen van het aantal chromosomen in de anafase van de eerste klievingsdeling lijkt het diploïde chromosoom – aantal weer aanwezig te zijn en concludeert Lieder: "Demnach dürfte eine Aufregulation des wahrscheinlich haploïden Eikernes in den diploïden Zustand noch vor der ersten Furchungsmiitose stattfinden." De verdienste van het artikel van Lieder (1959) is vooral dat er aandacht gevestigd wordt op de – in het Westen nog vrijwel onbekende – literatuur, die over dit onderwerp is verschenen; grotendeels in vrij onbekende tijdschriften, die in de eigen taal publiceren (Russisch, Pools, Hongaars en Roemeens). Blijkens het artikel van Lieder (1959) had Nikolski (1957) ook reeds gewezen op het ontbreken van mannetjes bij populaties van de zilversteenkarper (kroeskarper).

Hetzelfde is door Busnita (1957) gedaan terwijl verder onderzoek naar dit verschijnsel en hiermede direct verbandhoudende onderwerpen reeds was verricht door Busnita et al. (1959) en Driaglin (1949).

Cherfas (1966) onderzocht de gynogenetische éénslachtige en tweeslachtige subsoorten van deze zelfde vissoort. Het betrof hier exemplaren uit een Russische vijvercultuur, de "Volmen" populatie. Op grond van de verkregen resultaten ten aanzien van het aantal nucleolï en cytometrische data en chromosoom – aantallen (94 in de tweeslachtige en 141 in de éénslachtige exemplaren) acht Cherfas de triploïdie van de éénslachtige subsoort bewezen.

Gedurende de laatste jaren is een aantal artikelen gepubliceerd door een Japanse groep onderzoekers (Kobayasi, 1971, 1976, 1977; Kobayasi & Kawashima, 1971, 1972; Kobayasi & Ochi, 1972; Kobayasi et al., 1970, 1977). In 1977 rapporteren Kobayasi et al. (1977), dat zij uitsluitend triploïde goudviswijfjes ("ginbunas" – *Carassius auratus langsdorfii*) vingen in het Kanto district in Japan. Een enkel wijfje bevatte echter 206 chromosomen in plaats van het triploïde aantal van 156. Dit aantal kwam overeen met dat wat in een andere populatie uit het Chiba gebied werd gevonden. Deze vissen werden beschouwd als vertegenwoordigers van de 4n lijn. Om het voortplantingssysteem van deze 4n vissen te onderzoeken werden zij gekruist met een diploïde soort ("Kinbuna"), die in het Kasumigaur gebied (nabij het Chiba gebied) gevangen waren. Alle nakomelingen van deze kruising waren wijfjes, die precies op de moeder geleken en exact hetzelfde karyotype hadden. Op grond van deze bevindingen concluderen Kobayasi en zijn medewerkers, dat deze 4n nakomelingen waarschijnlijk ontstaan zijn door gynogenese uit de hybride kruising 4n ginbuna x 2n kinbuna.



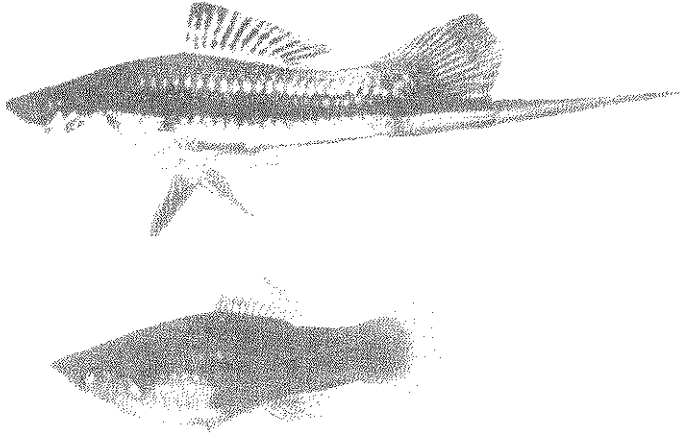
*Poecilia latipinna*

(Uit: N. H. Douglas, (1974) "Fleshwater Fishes of Louisiana". Claitor's Publishing Division, Louisiana).

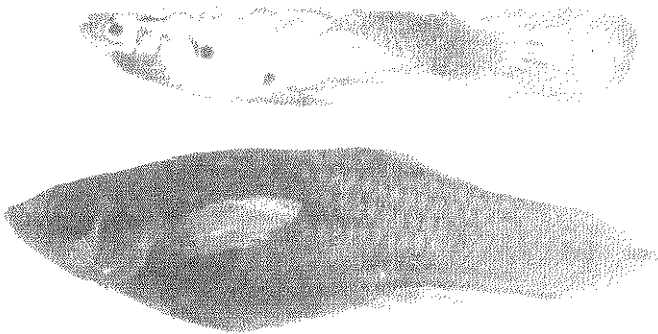


*Poecilia mexicana*

(Uit: W. L. Minckley, (1973) "Fishes of Arizona". Arizona Game and Fish Department, U.S.A.).



*Xiphophorus helleri* Heckel



*Lebistes reticulatus*  
(Uit: W. L. Minckley, (1973) "Fishes of Arizona". Arizona Game and Fish Department, U.S.A.).

Door Penaz en medewerkers (Penaz et al., 1979) wordt eveneens een goed overzichtsartikel geschreven, doch nu over de éénslachtige vissoort *Carassius auratus gibelio*. Het omvat met name een uitgebreide beschrijving van de morfologische ontwikkelingen gedurende de embryonale, larvale en juveniele periode, terwijl eveneens aandacht wordt besteed aan de gynogenetische wijze van voortplanten en een karyologische analyse. Tevens werden met eieren van de zilverkruis – karper ( *Carassius auratus gibelio* ) kruisingen uitgevoerd met sperma van de kopvoorn ( *Leuciscus cephalus* ), de baardvis ( *Barbus barbus* ), de brasem ( *Abramis brama* ) en de gewone kruiskarper ( *Carassius carassius* ). Op grond van deze studies wordt door de auteurs – in tegenstelling tot het voorstel van Hensel ( 1971 ) – een onderverdeling in subspecies van de *Carassius auratus* soort aanbevolen.

Lusk et al. (1977) en Holcik & Zitnam (1978) beschrijven een aantal vindplaatsen van *C. auratus gibelio* en geven een gedetailleerde verklaring van de geografische verspreiding. Zij concluderen, dat de zich in Tsjecho – Slowakije snel verspreidende vorm oorspronkelijk uit Hongarije stamt, alwaar deze soort in de buurt van Szarvas geïntroduceerd was met planten – etende vissen uit het Verre Oosten. Het zeer sterk overheersende percentage vrouwtjes in de Tsjechische populatie *C. auratus gibelio* (Lusk et al., 1977; Lusk & Barus, 1978) doet vermoeden, dat het een éénslachtige vorm is, die zich met behulp van gynogenese voortplant. Ook bij andere ondersoorten waren reeds afwijkende geslachtsverhoudingen of sterk overheersende aantallen vrouwtjes waargenomen: *C. auratus langsdorfi* (Kobayasi et al., 1970, 1973) en *C. auratus cuvieri* (Muramoto, 1975). Buiten Tsjecho – Slowakije was er reeds eerder bij *C. auratus gibelio* op hetzelfde verschijnsel geweest (Lieder, 1955, 1959; Golovinskaja et al., 1965; Cherfas, 1966). Alle vrouwtjes van deze eenslachtige populaties zijn triploïd.

## II – 2.2 Overige vissoorten

Parthenogenese wordt eveneens verondersteld door Spurway (1953) in een korte mededeling over een incidentele observatie bij het guppy ( *Lebistes reticulatus* ). Tevens meldt Spurway, dat amateur – kwekers bij verscheidene gelegenheden parthenogenese bij vissen hebben beschreven, maar kennelijk geen enkele herhaling van hun waarnemingen onder gecontroleerde condities hebben gepubliceerd. Wel wordt vijf jaar later door Stolk (1958) melding gemaakt van nieuwe gevallen bij dezelfde soort; in één geval bij de zwaarddrager, *Xiphophorus helleri* Heckel.

In tegenstelling tot de vrouwtjes, die door Spurway werden beschreven, waren de vrouwtjes in dit geval onmiddellijk na de geboorte geïsoleerd. Uit het eerste exemplaar werden na 18 maanden 22 vrouwtjes geboren en uit het tweede vrouwtje, na 15 maanden, 14 jongen – eveneens allemaal vrouwtjes. Ook het *Xiphophorus*

vrouwtje was onmiddellijk na de geboorte geïsoleerd. Toen zij een lengte van 71 mm had bereikt, werden 28 vrouwelijke visjes geboren. Hierna kreeg zij nogmaals een geheel uit vrouwtjes bestaand nageslacht. Microscopisch onderzoek van de spermakamers van de ovaria wees uit, dat er geen sperma aanwezig was, zodat de mogelijkheid van zelfbevruchting werd uitgesloten. Wel werd een infectie geconstateerd bij de ovaria: de fycomycete *Ichthyophorus hoferi* Plehn – Mulsow. Op grond van deze waarnemingen acht Stolk het waarschijnlijk, dat de parthenogenese veroorzaakt wordt door een pathologisch proces, waarbij het *Ichthyophorus* – gif de stimulus zou zijn voor de ontwikkeling van de onbevruichte eicellen. Stolk introduceert dan ook het begrip "pathologische parthenogenese" en pleit tenslotte voor een systematisch onderzoek naar de mogelijke pathologische processen in, of in de onmiddellijke nabijheid van, ovaria bij eventuele gevallen van parthenogenese.

Door Berg (1961) werd eveneens hybridisatie tussen tweeslachtige oudersoorten verondersteld als verklaring voor het ontstaan van de éénslachtige gynogenetische soort *Leuciscus cephalus* (de kopvoorn).

Recent is een nieuwe, uitsluitend uit vrouwtjes bestaande soort beschreven (Echele & Mosier, 1981). Het betrof hier een *Menidia* – soort die eveneens in de kustgebieden van de Golf van Texas voorkomt. Het genus *Menidia* behoort tot de familie der ATHERINIDAE. Echele en Mosier vingentotaal 141 dieren op twee verschillende lokaties die circa 280 kilometer van elkaar verwijderd waren. De éénslachtige soort kwam voor op plaatsen waar ook twee andere (tweeslachtige) soorten van hetzelfde genus voorkwamen: *Menidia beryllina* en *Menidia peninsulae*. De grote morfologische gelijkenis met deze twee, ook al moeilijk van elkaar te onderscheiden, soorten is de reden dat zij zo lang onopgemerkt kon blijven ondanks het feit dat er in dit gebied al eerder vrij intensieve veldstudies van vissen verricht waren. In tegenstelling tot de reeds beschreven éénslachtige soorten van de familie der POECILIIDAE, die levende jongen baren, leggen de *Menidia* – vissen eieren waardoor de éénslachtigheid moeilijker te detecteren is. Echele en Mosier concluderen dan ook dat de éénslachtigheid ook bij eieren – leggende vissen wel eens meer voor kan komen dan algemeen verondersteld wordt. Zij veronderstellen dat de soort vroeger is ontstaan door middel van hybridisatie tussen de twee bovengenoemde *Menidia* – soorten en zich met behulp van gynogenese voortplant.

## II – 2.3 Samenvatting en conclusies

In hoofdstuk II – 2 wordt een overzicht gegeven van de in de literatuur beschreven natuurlijke niet – zygogenetische wijzen van voortplanten bij vissen. Er zijn slechts bij twee vissen waarnemingen gedaan die als parthenogenese geïnterpreteerd werden. De overige waarnemingen betreffen allemaal gevallen van zygopar-

thenogenese. Hierbij worden in de literatuur twee vormen onderscheiden: gynogenese en hybridogenese. Dit onderscheid is gebaseerd op het moment waarop het genetisch materiaal van de vader wordt geëlimineerd. Het overgrote deel van de waarnemingen in het veld en het uitgevoerde laboratorium – onderzoek is aan drie vissoorten verricht : *Poecilia* , *Poeciliopsis* en *Carassius* . Bij alle drie de soorten is er sprake van zygotparthenogenese en worden fertiele nakomelingen verkregen.

Naast deze drie vrij uitvoerig bestudeerde vissoorten zijn er tevens enkele incidentele beschrijvingen bekend van andere, vermoedelijk eenslachtige soorten. Het betreft hier het bekende aquariumvisje het guppy ( *Lebistes reticulatus* ), de zwaarddrager ( *Xiphophorus helleri* ), de kopvoorn ( *Leuciscus cephalus* ) en een nog niet nader benoemde *Menidia* – soort.

De precieze onderliggende mechanismen zijn jarenlang onderwerp van diverse onderzoeken geweest. Begrippen als "selektieve meiose", "endomitosis", "pre – meiotische endoreplicatie", "endomitoses" en "zusterchromosoomparing" omschrijven evenzovele hypothesen. Deze hypothesen werden in meer of mindere mate ondersteund door experimenteel onderzoek. Hierbij werden met name de volgende technieken gehanteerd: weefseltransplantaties, DNA – metingen, elektroforese – onderzoek aan eiwitten, hybridisatie – experimenten en cytogenetisch onderzoek. Ook door veldstudies probeerde men aanwijzingen te vinden voor de vermoedelijke oudersoorten van de eenslachtige soorten wanneer hybridisatie als ontstaansmechanisme werd verondersteld. Het verspreidingspatroon van de eenslachtige soort werd vergeleken met dat van de vermoedelijke oudersoorten, deze verspreidingspatronen werden bovendien gerelateerd aan biologische en geografische factoren.

Concluderend kan worden gesteld dat er bij diverse vissoorten naast zygotenese verschillende afwijkende wijzen van voortplanten zijn beschreven die parthenogenese en twee vormen van zygotparthenogenese omvatten. Over de oögenese en de cytogenetische aspecten van deze wijzen van voortplanten zijn een aantal hypothesen geformuleerd die wel gemeenschappelijke elementen bevatten doch op onderdelen niet met elkaar overeen komen. Afdoende bewijs voor de juistheid van een van deze hypothesen is nog steeds niet geleverd. Daarvoor is meer cytogenetisch onderzoek aan ovaria vereist evenals een meer gedetailleerde studie naar de (mogelijke) rol van de zaadcel.



## HOOFDSTUK II – 3

### NATUURLIJKE PARTHENOGENESE BIJ AMFIBIEËN

#### II – 3.1 Inleiding

Reeds in 1853 werd door Leuckart (1853) waargenomen, dat onbevuchte kikkereieren zich aanvankelijk op vergelijkbare wijze ontwikkelen als bevruchte eieren: "Wir haben die Ueberzeugung gewonnen, dass die ersten Schritte der Embryonalentwicklung nicht selten auch in unbefruchteten Eiern stattfinden..... Wenn man einen Haufen von unbefruchteten Frosch eiern sorgfältig untersucht, so wird man hier und da gewiss einzelne Dotter finden, die in unverkennbarer Weise die ersten Stadien des Furchungsprozesses darbieten. In manchen Fällen kommt es allerdings nicht zu einer förmlichen Furchung, sondern nur zur Bildung einzelner Vertiefungen, die in der Richtung der ersten Furchungslinien verlaufen; aber bisweilen sieht man auch deutliche Fälle einer zwei – und Vierteilung." Ook Dehner (1872) deed soortgelijke waarnemingen. Hij was eveneens van mening, dat er sprake was van natuurlijke parthenogenese. Langs experimentele weg werden reeds lang geleden opvallende resultaten verkregen bij amfibieën. Deze experimenten werden verricht zowel door hybridisatie tussen verschillende soorten (Pflüger, 1882; Born, 1883; Hertwig, 1918, 1920; Tchou Su, 1936) als met behulp van met radium bestraalde en genetisch geïnactiveerde geslachtscellen (G. Hertwig, 1911, 1913, 1916; O. Hertwig, 1913; P. Hertwig, 1913, 1916, 1920) en met chemische stoffen (G. Hertwig, 1924; Loeb, 1909) of met fysische hulpmiddelen (Bataillon, 1910; Guyer, 1907; Loeb & Bancroft, 1913; J. Loeb, 1921; Hovasse, 1920, 1922 – A, B, en C, 1930)

Door Parmenter (1920, 1925, 1926, 1932, 1933, en 1940) werd veel onderzoek verricht naar de chromosomen van kikker – en pad – parthenogenonten. Uit kruisingen tussen een kikkervrouwkje en een mannetjespad ( *Rana esculenta* x *Bufo viridis* ) verkreeg Hertwig (1918) zowel haploïde dwergachtige als diploïde nakomelingen met normale afmetingen. Het merendeel van de eieren deelde pas op het moment, dat de controle eieren ( *Rana esculenta* x *Rana esculenta* ) reeds het viercellig stadium bereikten. Tien tot 25% deelde in hetzelfde tempo, terwijl een ander gedeelte in het geheel niet deelde. Alle onregelmatig gedeelde eieren stierven voor de gastrulatie, een embryonale ontwikkeling die normaal omstreeks de elfde dag plaatsvindt. De in het normale tempo delende embryo's (10 – 25%) waren haploïde larven, die na twee tot drie weken stierven. De vertraagd, maar regelmatig gedeelde eieren ontwikkelden zich bijna tot aan het metamorfose stadium en waren diploïd. Zij onderscheidden zich in deze latere stadia op geen enkele manier van de normale controle – larven. De verklaring van deze waarnemingen was volgens Hertwig: "Bei allen kreuzbesamten Esculenta – eiern beteiligt sich der Samenkern von *Bufo viridis* nicht an der Entwicklung, die daher als "eine parthenogenetische" zu bezeichnen ist; die Larven sind falsche Bastarde".

Twee jaar later (Hertwig & Hertwig, 1920) wordt een geheel ander resultaat verkregen uit hetzelfde type kruising, doch met een nieuwe, in de natuur gevangen, vrouwtjeskikker. Nu deelde 60% (in plaats van 10 – 25%) van de eieren op hetzelfde moment als de controle – groep, terwijl er geen enkel later delend ei werd

waargenomen. Opvallend was ook, dat alle larven diploïde vrouwtjes waren, terwijl de controle – groep geheel triploïd was! Als twee mogelijke verklaringen worden gegeven: het achterwege blijven van de chromosoomreductie tijdens de eirijping en het feit, dat het hier een tetra – of triploïd vrouwtje betrof, dat – ondanks een normale chromosoomreductie – diploïde eieren produceerde.

### II – 3.2. Urodela : salamanders

De eerste waarneming van in de natuur voorkomende gynogenese bij een amfibie met slechts één ouder is door Clanton (1934) gedaan. Tijdens een veldstudie van de levensgeschiedenis van de salamander, *Ambystoma jeffersonianum*, in het Zuiden van Michigan gedurende de jaren 1928 – 1932 werden door Clanton opmerkelijke waarnemingen verricht. In bovengenoemde streek komt deze salamandersoort in twee, verwarrend veel op elkaar gelijkende vormen, voor, die echter weinig of geen verschil in activiteiten vertonen. De meest opvallende verschillen tussen de beide volwassen vormen zijn pigmentatie – patroon en eigrootte. De donkere, erg zwarte, vorm is sterk gepigmenteerd aan de buikzijde, terwijl de lichtere vorm minder sterk is gepigmenteerd en meer grijs is aan de buikzijde. De donkere vorm produceert ook donkerder en kleinere eieren dan de lichte vorm. Bovendien leggen de donkere vrouwtjes gemiddeld 216 eieren, terwijl de lichter gekleurde vrouwtjes er slechts 142 leggen. De geslachtsverhouding in de natuur varieerde van 2 tot 52 vrouwtjes op één mannetje. De donkere individuen komen vooral voor in populaties met ongeveer evenveel mannetjes als vrouwtjes; de lichtgekleurde vorm komt bijna uitsluitend als vrouwtjes voor.

Uit laboratorium – kruisingen bleek, dat er uitsluitend lichtgekleurde vrouwelijke nakomelingen voortkwamen uit de kruising donker mannetje x licht vrouwtje. Hoewel er geen, of slechts zeer incidenteel, licht – gekleurde mannetjes werden aangetroffen, wordt de mogelijkheid van gynogenese door Clanton niet naar voren gebracht; hij volstaat met de constatering: "Matings of both kinds of females, under similar conditions, show that dark females produce both male and female offspring while light females produce offspring like themselves in appearance and sex".

Later worden Clanton's bevindingen door Minton (1954) bevestigd, die – op basis van eigen waarnemingen – de reeds vroeger gebezigde naam "Lateral Hollowell 1875" aan het *Jeffersonianum* complex toevoegt. Minton omschrijft vervolgens de donkere dieren als *Ambystoma laterale* en de lichter gekleurde dieren als *Ambystoma jeffersonianum*. Evenals Clanton interpreteert hij de laatsten als hybriden.

In 1957 publiceren Humphrey & Fankhauser (1959) de resultaten van een studie van het ontstaansmechanisme van spontane, dus natuurlijke, en experimentele haploïde nakomelingen van de Mexicaanse axolotl, *Ambystoma* ( of *Siredon* ) *mexicanum*. Kruisingen werden uitgevoerd met laboratoriumkweken van dieren met contrasterende kleurpatronen: het donkere wilde type (DD) en de witte, gedeeltelijk

albino, mutant (dd). Reciproke kruisingen wezen uit, dat – indien de moeder wit was – het percentage witte nakomelingen tweemaal zo groot was als wanneer de vader deze kleur had.

Naast de kleurkenmerken werden eveneens de chromosoom – aantallen bepaald in preparaten van cellen uit de staart. Hoewel uiteraard zeer veel nakomelingen normale donkere embryo's waren, werden toch voldoende haploïde witte en donkere exemplaren verkregen om gefundeerde conclusies te kunnen trekken omtrent de natuurlijke percentages andro- en gynogenetische embryonale ontwikkelingen; deze bedroegen respectievelijk:

kruising	aantal jongen	gynogenese	androgenese
mannetjes DD x vrouwtjes dd	31.273	213 (6,81%)	11 (0,35%)
mannetjes dd x vrouwtjes DD	23.154	4 (0,17%)	17 (0,73%)

Het percentage gynogenetische ontwikkelingen blijkt dus bij witte vrouwtjes 40 maal hoger te zijn dan bij donkere vrouwtjes, terwijl het percentage androgenetische haploïden ongeveer de helft bedraagt. Uit longitudinale studies blijkt onder andere, dat de mate waarin haploïde ontwikkeling voorkomt, niet afhankelijk is van de leeftijd van het vrouwtje; dat deze ontwikkeling op erfelijke eigenschappen lijkt te berusten en dat er geen invloed is van de bevruchtende zaadcellen. Het is waarschijnlijk, aldus Humphrey & Fankhauser, dat de genetische basis is ontstaan door inteelt en berust op homozygote recessieve genen.

Twee jaar later publiceren Fankhauser & Humphrey (1959) de resultaten van twaalf broedseizoenen (1945 – 1956), waarin 109.445 nakomelingen werden onderzocht uit 254 broedsels van diploïde ouders; 2619 embryo's uit 30 broedsels van tetraploïde vrouwtjes en diploïde mannetjes, en 3636 embryo's uit 48 broedsels van triploïde vrouwtjes en diploïde mannetjes. Het onderzoek richtte zich speciaal op de mechanismen, die de afwijkende chromosoomaantallen veroorzaakten. Onder de 109.445 onderzochte embryo's van diploïde ouders bevonden zich 0,42% haploïde, 0,16% triploïde, 0,03% tetraploïde, 0,17% pentaploïde, 0,00% hexaploïde en 0,06% mozaïek embryo's; totaal 1,0% heteroploïden. Verreweg het grootste percentage mozaïekembryo's werd gevormd door het haploïde – diploïde type. Bij de kruisingen met triploïde vrouwtjes en diploïde mannetjes werden 2,30% heteroploïde embryo's gevonden; de rest was aneuploid. Bij de tetraploïde x diploïde kruisingen tenslotte werden 2,10% afwijkende heteroploïde embryo's gevonden, dat wil zeggen niet – triploïde. De haploïde embryo's van deze laatste kruisingen moeten van androgenetische oorsprong zijn, de diploïde van gynogenetische. Hoewel ook uit deze studies bleek, dat bepaalde vrouwtjes meer

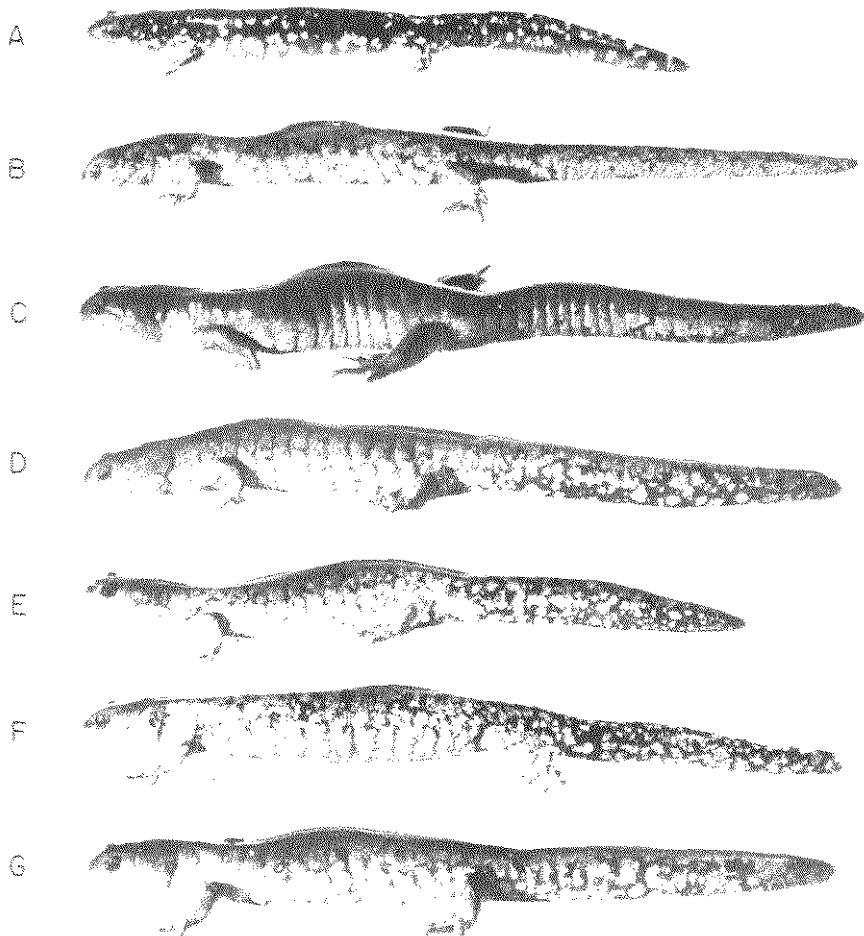
heteroploïde nakomelingen krijgen dan andere vrouwtjes, was het voor Fankhauser & Humphrey niet mogelijk de feitelijke erfelijkheidsvorm van deze afwijkingen te karakteriseren.

In 1963 werd door Uzzell (1963) het bestaan van diploïde en triploïde vrouwtjes aangetoond bij, met *Ambystoma jeffersonianum* verwante, salamanders. Bij laboratoriumkweken van, in de natuur gevangen, salamanders bleken drie van de vijf – met behulp van chromosoomtellingen geanalyseerde – broedsels geheel triploïd te zijn, terwijl de andere twee geheel diploïd waren. Het was bekend, dat de vrouwtjes van het *Ambystoma jeffersonianum* complex in bepaalde gebieden dimorfisch zijn wat betreft de grootte van de erythrocyten en de erythrocytenkern; in een ander gebied wordt deze dimorfie niet gevonden. De mannetjes zijn in alle verspreidingsgebieden uniform. Zoals te verwachten, bleken de "grootcellige" vrouwtjes triploïd en de "kleincellige" diploïd te zijn. Van 377 embryo's uit broedsels van zes grootcellige vrouwtjes konden er 212 grootgebracht worden. Tijdens de metamorfose werd het geslacht van deze embryo's bepaald; het bleken alle vrouwtjes te zijn. Van 269 embryo's uit broedsels van vier kleincellige vrouwtjes bleek 40% uit uit mannetjes te bestaan. Het blijkt dus, dat nakomelingen lingen van triploïde vrouwtjes altijd triploïd en van het vrouwelijk geslacht te zijn. Een en ander wijst erop, aldus Uzzell, dat er aparte zich voortplantende populaties triploïde vrouwtjes zijn, die verwant zijn aan bepaalde populaties van de twee diploïde species: *A. jeffersonianum* en *A. laterale*. De hieraan ten grondslag liggende oögenese en bevruchting worden later beschreven.

Samen met Macgregor komt Uzzell (Macgregor & Uzzell, 1964) tot de conclusie, dat hier sprake is van gynogenese: voor de voortplanting bij triploïde vrouwtjes is bevruchting door een mannetje van het *A. jeffersonianum* complex noodzakelijk; dit kunnen zowel *A. jeffersonianum* als *A. laterale* mannetjes zijn. Ten aanzien van de oögenese wordt verondersteld, dat de meiose in triploïde vrouwtjes voorafgegaan wordt door endomitose; de primaire oöcyten bevatten 84 chromosomen ( $n = 14$ ) en zijn dus hexaploïd. De tijdens de endomitose gevormde zusterchromosomen zijn door middel van chiasma's in paren verbonden en vormen 42 bivalenten; na de twee meiotische delingen worden eicellen met 42 chromosomen gevormd. Er werd een sterk verhoogd aantal chiasma's gevonden (in triploïde oöcyten gemiddeld 414 en in diploïde 68). Dit grote aantal kan echter niet in nieuwe genetische combinaties resulteren omdat de chromosomen, waartussen de chiasmata optreden, waarschijnlijk identiek zijn.

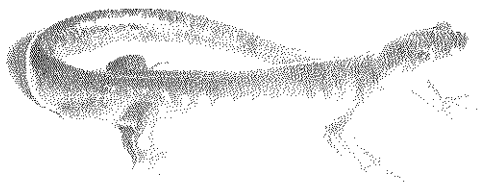
Een meer gedetailleerde studie van de relaties tussen de diploïde en triploïde soorten verschijnt een jaar later: Uzzell (1964) In dit artikel postuleert Uzzell, dat er een triploïde populatie zou zijn ontstaan door hybridisatie van de twee diploïde ouderspecies en dat deze triploïde populatie later in twee verschillende vormen divergeert als resultaat van een seksuele selectie: die triploïde vrouwtjes, welke het meest op de vrouwtjes van de diploïde soort lijken, waarmede zij samen in eenzelfde

Vertegenwoordigers van de twee- en éénslachtige *Ambystoma*



A: *A. laterale*, vrouwtje  
B: *A. texanum*, vrouwtje  
C: *A. texanum*, mannetje  
D: diploïde éénslachtige hybride

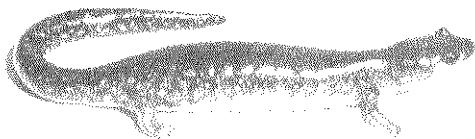
E: diploïde éénslachtige hybride  
F: triploïde éénslachtige hybride  
G: triploïde éénslachtige hybride  
(Uit: Downs, 1978)



A



B



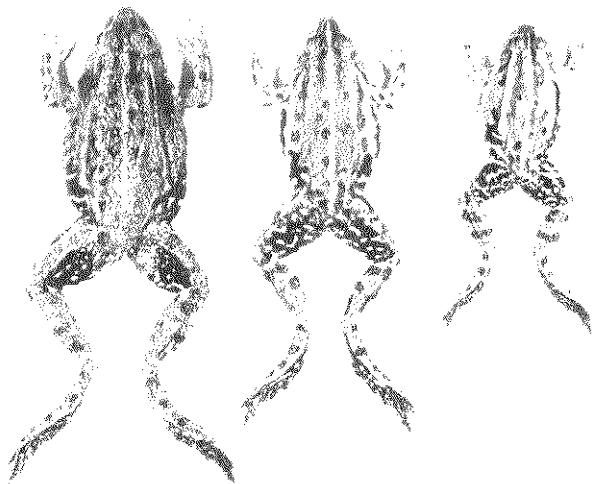
C

A: volwassen mannetje *Ambystoma jeffersonianum*; lengte 173 mm.

B: volwassen vrouwtje *Ambystoma laterale*; lengte 120 mm.

C: vermoedelijk hybride *Ambystoma laterale* x *jeffersonianum*; lengte 140 mm.

(Uit: Minton, 1954)



Drie vrouwelijke  
exemplaren van  
de groene kikker

A: *Rana ridibunda*

B: *Rana esculenta*

C: *Rana lessonae*

(Uit: Engelman, 1973)

A

B

C

verspreidingsgebied voorkomen, zouden een voordeel hebben om de aandacht van de diploïde mannetjes te krijgen vergeleken met de triploïde vrouwtjes, welke meer intermediair zijn of meer op de vrouwtjes van de andere diploïde species lijken. Met behulp van gel – elektroforese – analyses van serum – eiwitten van de vier soorten van het *Ambystoma jeffersonianum* complex ( twee bisexuele diploïden : soorten *A. jeffersonianum* en *A. laterale* , en twee triploïde, nagenoeg uitsluitend uit vrouwtjes bestaande soorten *A. platineum* en *A. tremblayi* ) geven Uzzell & Goldblatt (1967) een verklaring voor de morfologische verschillen voor het ontstaan van de twee triploïde populaties. Alle eiwitbanden, welke bij de triploïden gevonden werden, kwamen ook voor in één van de twee diploïde soorten. Dit bandenpatroon, de intermediaire morfologische kenmerken van de triploïde populaties, en de geografische gegevens duiden erop, dat de triploïde soorten zijn ontstaan door hybridisatie van *A. laterale* en *A. jeffersonianum* . Op grond van de relatieve dichtheid van de banden is het waarschijnlijk, dat *A. tremblayi* twee sets chromosomen van *A. laterale* en 1 set van *A. jeffersonianum* heeft, terwijl *A. platineum* twee sets van *A. jeffersonianum* en 1 set van *A. laterale* bezit.

Het is opvallend, dat Uzzell in geen enkele publikatie uit 1967 of eerder wijst op de reeds beschreven (zie II – 2) analoge situaties bij vissen. Hij vermeldt alleen, dat bij het *Poecilia* complex de hybride nog steeds verkregen kan worden uit kruisingen met de beide oudersoorten, terwijl – bij het *Ambystoma* complex de veronderstelde ouderspecies *A. jeffersonianum* en *A. laterale* in broedkooien niet meer paren en dus geen hybriden produceren.

In 1948 rapporteerde Michalski (1948) eveneens het voorkomen van parthenogenese bij een andere salamandersoort: *Eurycea bislineata* . Uit een onderzoek naar de chromosoomaantallen bij 412 larven bleek, dat er zich bij dit aantal 5 haploïde en 21 triploïde dieren bevonden. Van de vijf haploïde exemplaren waren er twee volledig, twee hoofdzakelijk en één gedeeltelijk haploïd. Alle vijf larven vertoonden een vertraagde dwergachtige ontwikkeling en een geringe vitaliteit.

### II – 3.3 Ranidae: kikkers

Berger (1966) geeft een overzicht van de vele tegenstrijdige opvattingen inzake de mate van verwantschap tussen drie Europese vormen van de groene kikker. Vervolgens beschrijft hij 276 exemplaren, die hij tijdens het broedseizoen had gevangen op verschillende lokaties in Poznan. Binnen deze populaties onderscheidde Berger aan de hand van uitsluitend morfologische kenmerken drie groepen: *lessonae*, *esculenta* en *ridibunda*. Deze, reeds eerder gebruikte namen werden door Berger om zuiver praktische redenen gegeven zonder dat hieraan vooralsnog enige systematische waarde gehecht kon worden.

Günther (1968) verrichtte een morfologisch en ecologisch onderzoek naar de verschillen tussen *Rana esculenta* L. en *Rana ridibunda* Pall., die in diverse wateren rond Berlijn en Leipzig waren gevangen in de periode mei – juni 1965. Günther concludeerde dat ecologische factoren de oorzaak zijn van het optreden van kleinere en grotere populaties *Rana esculenta* : "..... Die " *lessonae* " Form van *Rana esculenta* wird als eine ökologische Zustandsform ("Oekotyp") angesehen...".

Met behulp van een leukocytencultuur verrichtte Günther (1970) later cytogenetisch onderzoek bij *Rana ridibunda* en *Rana esculenta*. Er werden geen verschillen gevonden tussen de karyotypen van de beide vormen. Wel werden er tussen 24 fenotypisch gelijke *esculenta* exemplaren zeven triploïde dieren gevonden. Verondersteld werd, dat deze hoge frequentie van triploïdie een gevolg zou zijn van een storing in de meiose en een mogelijke verklaring voor de – bij deze vorm – dikwijls aangetroffen verminderde fertiliteit.

Berger (1967) beschrijft de resultaten van kruisingen tussen deze drie morfologische vormen. Gebaseerd op de ontwikkelingssnelheden en de sterftepercentages van de larven uit deze kruisingen komt Berger tot de conclusie, dat de *esculenta* vorm waarschijnlijk de hybride is van de twee andere groene kikkervormen. Een soortgelijk onderzoek was reeds eerder door Pflüger in 1883 uitgevoerd, volgens Boulanger (1885 – B) en in latere jaren door Bolkay (1901); Mandeville & Spurway (1949) en Smith (1949). Deze auteurs bestudeerden de hybridisatie tussen *esculenta* en *ridibunda*.

De resultaten van deze studies hadden echter geen wijziging in de opvattingen ten aanzien van de verwantschap van deze vormen tot gevolg. Later bestudeert Berger de morfologie van de F – 1 generaties uit de verschillende kruisingen. In totaal werden ruim 1200 volwassen exemplaren onderzocht, terwijl er nog eens bijna 500 exemplaren gebruikt werden voor verdere kruisingsexperimenten. Uit de analyse van de erfelijkheid van de verschillende kenmerken bleek, dat:

1) allen de *lessonae* – en de *ridibunda* – vormen nakomelingen produceren, die op de ouders gelijken, terwijl de hybriden tussen deze vormen mengkenmerken vertonen en als *esculenta* vorm worden beschreven;

2) de *esculenta* vorm nakomelingen krijgt, waarvan 96,5% de typische kenmerken van de *ridibunda* vorm vertonen;

3) exemplaren van de F – 1 generatie met kenmerken van de *esculenta* vorm voor 99% nakomelingen van hybridisatie zijn;

4) de *esculenta* vorm, na kruising met *lessonae*, nakomelingen produceert met *esculenta* kenmerken, terwijl in het geval van een kruising met *ridibunda*, de nakomelingen *ridibunda* kenmerken vertonen. De kenmerken van de *esculenta* vorm zijn dus dominant ten opzichte van *lessonae*, maar recessief ten opzichte van *ridibunda*. De dominantie van *ridibunda* kenmerken komt ook tot uiting in de nakomelingen van de *esculenta* vorm.



In latere experimenten verkreeg Berger (1970) zeer opvallende resultaten uit onderlinge kruisingen met *esculenta* – typen. Slechts één van de 35 *esculenta* paren kreeg nakomelingen, die niet reeds in het larvale stadium stierven, zoals bij de overige paren het geval was, doch larven, die de metamorfose ondergingen. Twee van deze nakomelingen hadden het fenotype van *esculenta* en 28 het *ridibunda* fenotype. Bovendien waren het uitsluitend vrouwtjes, die geen eieren legden. Berger (1968) benadrukt de mogelijke beperking van deze resultaten als gevolg van het feit, dat het uitsluitend dieren uit Poznan betrof. Om antwoord te kunnen geven op de vraag in hoeverre deze gevonden relaties ook gelden voor populaties van deze vormen, die elders in Europa leven, worden soortgelijke studies gemaakt door Günther (1969 en 1973) en door Blankenhorn et al (1971). Ook deze onderzoekers kwamen, zij het op verschillende gronden, tot dezelfde conclusies als Berger.

De hybride oorsprong van *Rana esculenta* werd bovendien met behulp van elektroforese – studies van serumeiwitten bevestigd door Turner (1970, 1972 en 1973), Engelmann (1972 en 1973), Uzzell & Berger (1975), Wijnands & Van Gelder (1976) en Wijnands (1978). Een overzichtsartikel over de belangrijkste literatuur betreffende het hybride karakter van *Rana esculenta* is door Hotz (1974) geschreven. Blankenhorn et al. (1971) onderzochten in hoeverre de resultaten van Berger (1964, 1970) overeenkwamen met een populatie kikkers uit een geheel ander verspreidingsgebied, namelijk het kanton Zürich. Daartoe werden 210 exemplaren gevangen, welke eerst op morfologische kenmerken ingedeeld werden in de drie typen, *lessonae*, *esculenta* en *ridibunda*. Vervolgens werden kruisingsexperimenten met deze dieren verricht. De resultaten hiervan kwamen overeen met die van Berger met dien verstande, dat alle nakomelingen uit de kruisingen *esculenta* x *esculenta* tussen de 5de en 9de week (dus nog in het larvestadium) stierven. Ook werd door Blankenhorn (1973) een onderzoek naar de verspreiding en het voorkomen van de drie *Rana* typen verricht in het kanton Zürich. Het bleek, dat in geen der onderzochte gebieden alle drie typen voorkomen, doch dat soms geen *lessonae* typen aanwezig waren en soms geen *ridibunda* typen. Blankenhorn geeft hiervoor geen mogelijke verklaring, doch volstaat met het vermelden van de vangstresultaten.

Turner (1970) onderzocht de serumeiwitten van 502 groene kikkers van 28 vindplaatsen in, hoofdzakelijk, Oostenrijk. De scheidingspatronen, die met behulp van polyacrylamide – elektroforese werden verkregen, duiden op het hybride karakter van het *esculenta* type. Een andere studie van 74 groene kikkers, die afkomstig waren van 10 verschillende vindplaatsen in de omgeving van Mainz, het Rijn – Main gebied, gaf gelijke resultaten.

Turner (1973) onderzocht ook kikkers uit de omgeving van Poznan, die hij van Berger had gekregen. Het waren 7 *ridibunda*, 13 *lessonae* en 27 *esculenta* typen. Voorts werden 29 F – 1 hybriden en 10 exemplaren uit terugkruisingsexperimenten onderzocht. Ook nu werd het hybride karakter van het *esculenta* type aangetoond.

Een jaar later beschrijft Turner (1974) een klonenstructuur bij een kikkerpopulatie uit de Neusiedlersee, die uit mannetjes en vrouwtjes van het *lessonae* type bestaat en uit het *esculenta* type, waarvan alleen vrouwtjes werden aangetroffen. Turner verklaart deze populatieopbouw door hybridogenese te veronderstellen (Schultz, 1969) als voortplantingsmechanisme. Deze verklaring wordt later door Uzzell & Berger (1975) bevestigd met behulp van elektroforese studie van zes enzymen. Door verschillende combinaties van deze enzymen te vergelijken konden vier genetisch verschillende klonen worden onderscheiden in de *Rana esculenta* populatie, welke leeft met en voor de voortplanting afhankelijk is van R.I ( het LE systeem ). Slechts twee klonen werden onderscheiden in de *Rana esculenta* populatie van het RE systeem.

Günther (1974) geeft eerst een overzicht van de verspreiding in de DDR van de drie *Rana* vormen. *Esculenta* heeft het grootste verspreidingsgebied en werd ook het meest aangetroffen. De *ridibunda* vorm kwam in de meest marginale omstandigheden voor en *lessonae* blijkt het best bestand te zijn tegen extreem hoge en lage temperaturen ; *esculenta* het slechtst.

Uit later onderzoek concludeert Günther ( 1975 – A en B ) echter, dat er bij *Rana esculenta* ook recombinatie en selectieve processen kunnen optreden. Ook vond hij *esculenta* populaties, die kennelijk in staat zijn zichzelf in stand te houden. Op grond van deze resultaten en de bevindingen van Turner (1974) moet dus de conclusie getrokken worden, dat *Rana esculenta* niet overal op dezelfde wijze in stand wordt gehouden.

Ook in Nederland is onlangs een dergelijk onderzoek verricht. In een proefschrift (Wijnands, 1979 – B), dat – behalve een inleiding van één bladzijde en een samenvatting plus epiloog van totaal twee – en – een halve bladzijden – vier samengevoegde tijdschrift – artikelen bevat (Wijnands & Van Gelder, 1976; Wijnands, 1977, 1978 en 1979 – A) worden de kenmerken, de verspreiding en het voortbestaan van de drie *Rana* typen in bepaalde streken in Nederland beschreven. Er bleken belangrijke verschillen te bestaan tussen de albuminepatronen van *ridibunda* uit Frankrijk en Nederland : de Nederlandse *ridibunda* lijkt meer op de *esculenta* dan de Franse. Op grond van het feit, dat er in het bemonsterde gebied in Frankrijk uitsluitend (waarschijnlijk zuivere) *ridibunda* populaties werden aangetroffen, terwijl er in Nederland behalve *ridibunda* ook *lessonae* en *esculenta* volop voorkomen, concludeert Wijnands ( 1978 ), dat er een zekere mate van introgressie tussen *lessonae* en *ridibunda* mogelijk is en er bij *esculenta* dus geen volledige hybridogenese optreedt. Deze suggestie wordt ondersteund door biometrische gegevens ( Wijnands, 1977 ). Tenslotte blijkt uit kweekexperimenten, dat *esculenta* in het gebied rond Nijmegen vrijwel uitsluitend geproduceerd wordt door terugkruising met *lessonae*. Dit laatste type zou dus, behalve zichzelf, ook *esculenta* in stand moeten houden. Het volgens Wijnands noodzakelijke speciale mechanisme, dat voldoende produktie van *lessonae* zou moeten waarborgen, zou

kunnen berusten op de waargenomen gedeeltelijke, tijdelijke en ruimtelijke isolatie van *esculenta* en *lessonae*.

Anno 1982 is/zijn de juiste wijze(n) van voortplanten en de manier, waarop de *esculenta* vorm zich in stand zal houden, nog steeds niet duidelijk. Wel lijkt het voorkomen van triploïde *esculenta* exemplaren een grote rol te spelen (Wijnands, 1979 – B). Het lijkt erop, dat er een verband bestaat tussen het aandeel van *esculenta* in de populatie en het percentage triploïde *esculenta*, dat in de populatie aanwezig is. Dit percentage is als regel laag indien *esculenta* en een van zijn ondersoorten (veelal *lessonae*) in ongeveer gelijke aantallen voorkomen (Günther, 1975B). *esculenta* vorm zich in stand zal houden, nog steeds niet duidelijk. Wel lijkt het voorkomen van triploïde *esculenta* exemplaren een grote rol te spelen.

## II – 3.4 Samenvatting en conclusies

In hoofdstuk II – 3 wordt de literatuur over natuurlijke niet – zygogenetische ontwikkelingen bij amfibieën besproken. Het is al lang bekend, dat onbevruichte amfibie – eieren zich in beperkte mate kunnen ontwikkelen op een wijze, die vergelijkbaar is met de ontwikkeling van normaal bevruchte eieren. Zygo-parthenogenetische ontwikkelingen werden waargenomen bij laboratorium – kruisingen tussen kikkers en padden. Ook in de natuur bleek deze ontstaanswijze voor te komen. Naast gynogenese werd er ook androgenese waargenomen. Bij een salamandersoort, *Ambystoma jeffersonianum*, bleken zowel diploïde als triploïde vrouwtjes voor te komen. Bij de triploïde dieren bleek gynogenese op te treden. De oorsprong van de triploïdeie werd geanalyseerd met behulp van gel – elektroforese studies aan serum – eiwitten. Behalve bij salamandersoorten zijn bovengenoemde waarnemingen ook bij kikkers gedaan. Het betrof hier drie verschillende vormen van de groene kikker. Uit kruisingen met deze drie vormen bleek onder andere dat de *esculenta* – vorm door hybridisatie is ontstaan uit een kruising tussen een *lessonae* – en een *ridibunda* – vorm. Deze hybride oorsprong werd met behulp van elektroforese – studies van serum – eiwitten bevestigd. Hoewel het hybride karakter van de *esculenta* – vorm dus is aangetoond, is nog steeds niet duidelijk op welke wijze de *esculenta* – vorm zich voortplant.

Concluderend kan worden vastgesteld dat er bij amfibieën in de natuur slechts bij de groene kikker, *Rana esculenta*, en bij twee salamandersoorten, *Ambystoma jeffersonianum* en *Eurycea bislineata*, niet – zygogenetische wijzen van voortplanten beschreven zijn. Evenals bij de vissen betreft het hier een hybridisatie. Zowel bij de kikker als bij de salamanders is er sprake van zygo-parthenogenese.

In tegenstelling tot de vissen treft men, naast diploïde en triploïde dieren, bij een van de salamandersoorten ook haploïde zygoparthenogenonten aan. De ontstaanswijze van deze haploïde dieren is echter nog niet opgehelderd. Evenmin is onderzocht of deze, zeldzaam voorkomende haploïde zygoparthenogenonten fertiel zijn. Zij bleken wel minder levensvatbaar en minder vitaal te zijn. Ook bleek uit kruisingsexperimenten dat de triploïde vrouwtjes wel fertiel zijn en altijd vrouwelijke triploïde nakomelingen geven. Zoals reeds eerder werd vermeld, is er ook bij de groene kikker sprake van hybridisatie. Hoewel het hybride karakter van deze dieren op verschillende wijzen is aangetoond is er nog steeds geen duidelijkheid over het juiste ontstaansmechanisme van deze zygoparthenogenonten en de precieze wijze van voortplanten.

## HOOFDSTUK II – 4

### NATUURLIJKE PARTHENOGENESE BIJ REPTIELEN

#### II – 4.1 Eerste aanwijzing voor het mogelijk voorkomen van natuurlijke parthenogenese bij Reptielen

In 1919 beschreef Schmidt (1919) een collectie van 63 kameleons, die uitsluitend uit vrouwtjes bestond. Het feit, dat er geen mannetjes gevangen waren werd door Schmidt wel opvallend genoemd, doch niet in verband gebracht met de mogelijkheid van parthenogenese. Schmidt constateerde slechts: "The present collection contains sixty – three specimens, all – curiously – females...".

Eenzelfde waarneming werd door Smith (1935) gedaan. Ook hij zag geen verband met het mogelijk voorkomen van parthenogenese toen hij, bij een gekkosoort, *Hemidactylus garnoti*, geen mannetjes aantrof: "I have examined more than 100 examples of this Gecko, but have so far failed to see a male." Een jaar later wordt hetzelfde geconstateerd door Lantz en Cyren (1936) bij de hagedissensoort *Lacerta saxicola armeniaca*. "*Lacerta saxicola armeniaca* est une forme bien caractérisée et relativement peu variable. Ce qui est étrange, c'est qu'on n'en connaît pas le mâle. L'un de nous (L.A.L.) l'a vainement cherché dans la région au N. – O. du lac GokTsha, où armeniaca abonde. En plus d'une quarantaine d'exemplaires qui furent capturés, un nombre au moins égal fut observé sans qu'il se trouvât parmi eux aucun mâle, quoique les jeunes fussent nombreux..... On se trouve ici en présence d'une anomalie biologique fort étrange, d'autant plus que chez les lézards les mâles dont d'habitude plus nombreux que les femelles." Lantz en Cyren vermoedden dus wel, dat dit geen toeval was, maar waarschijnlijk op een vreemde biologische "afwijking" berustte.

In een monografie over de reptielenfauna van Armenië wees Tschernov (1939) op het feit, dat hij slechts zeven mannetjes had gevonden tussen een door hem onderzochte populatie van 180 *armeniaca* – exemplaren.

Later werd door Darevsky (1957) aangetoond, dat deze zeven mannetjes tot een andere ondersoort behoorden, zodat toen geconcludeerd kon worden, dat ook Tschernov alleen maar *armeniaca* – vrouwtjes had waargenomen. Tevens wees Darevsky op het feit, dat er ook bij twee andere ondersoorten, *rostombekowien dahli*, geen mannetjes voorkwamen. Darevsky zal de eerste zijn, die het bestaan van natuurlijke parthenogenese bij reptielen aantoonde. Hij deed dit bij soorten van het "*Lacerta saxicola* complex". Deze familie, de LACERTIDAE, zal dan ook als eerste worden besproken.

## II-4.2 Squamata: Suborde Sauria

### II-4.2.1 Lacertidae: Hagedissen van de Oude Wereld

In 1958 beschrijft Darevsky (1958) een experiment, waarmee het voorkomen van parthenogenese als natuurlijke wijze van voortplanten bij *Lacerta saxicola* wordt aangetoond. Eind September 1956 werden 30 *Lacerta saxicola armeniaca* vrouwtjes van verschillende leeftijden (waaronder 15 onvolwassen dieren) gevangen. Zij werden in een kleine, voor andere dieren ontoegankelijke ruimte geplaatst in hun natuurlijke omgeving. Begin april 1957, na overwintering, werden de dieren in een speciaal geconstrueerd "openluchthok" ondergebracht, waardoor contact met mannetjes ook toen onmogelijk was. Begin Juli begonnen de 16 nog in leven zijnde vrouwtjes eieren te leggen en tussen medio en eind Augustus waren 56 hagedissen uitgekomen, die later allemaal vrouwtjes bleken te zijn. Zes van de eierenleggende vrouwtjes waren jonge exemplaren, die hun eerste voortplantingsperiode doormaakten. Hiermede was volgens Darevsky het bestaan van natuurlijke parthenogenese in *Lacerta saxicola* bewezen. Dit experiment werd in 1961 nogmaals beschreven (Darevsky en Kulikova, 1961), doch ditmaal meer gedetailleerd en in het Duits in plaats van Russisch, waarin het oorspronkelijke artikel in 1958 was gepubliceerd.

Tevens werd cytologisch onderzoek verricht. Dit wees uit, dat de parthenogenetische vrouwtjes diploïd waren ( $2n = 36$ ) en dat de eerste stadia van de oögenese bij deze vrouwtjes op dezelfde wijze verliepen als bij de tweeslachtige soorten. In beide gevallen vindt een normale eerste en tweede meiotische deling plaats. Diploïdie wordt hersteld door fusie van het tweede poollichaampje met de eicel of door fusie van de twee haploïde kernen van de eerste klievingsdeling. Darevski en Kulikova veronderstellen, dat de parthenogenetische hagedissen ontstaan zijn uit een natuurlijke hybridisatie tussen twee verschillende soorten. In gebieden, waarin zowel parthenogenetische als tweeslachtige (uit paring ontstane) dieren voorkwamen, werden dikwijls duidelijke bastaarden waargenomen. onder andere bij parthenogenetische *armeniaca* en uit mannetjes en vrouwtjes bestaande *terentjevi* populaties. Tevens werden zwangere parthenogenetische vrouwtjes, die duidelijke bijtsporen van mannetjes vertoonden (hetgeen als bewijs van een paring werd beschouwd) in het laboratorium verder gekweekt. Achtien bevruchte parthenogenetische vrouwtjes legden totaal 58 eieren. Alle levend uit het ei gekomen bastaarden waren vrouwtjes. Zij bezaten zeer sterk gereduceerde ovaria, waarin geen oöcytrijping tijdens de voortplantingsperiode kon worden waargenomen. Ook de eileiders waren aanzienlijk gereduceerd. Tevens werd geconstateerd, dat deze bastaardvrouwtjes niet de normale paringsreacties bij mannetjes opriepen. Het is dan ook niet verwonderlijk, dat deze dieren steriel bleken te zijn. Het feit, dat er alleen bastaardvrouwtjes uit de eieren kwamen, wordt verklaard door de veronderstelling dat de mannelijke embryo's voortijdig sterven. Bij de parthenogenetische *Lacerta saxicola dahli* en *Lacerta saxicola rostombekowi*

werden wel respectievelijk 7,6% en 5,1% bastaardmannetjes uit eieren verkregen. Deze bleken echter allemaal sterk misvormd te zijn en stierven een tot twee dagen nadat zij uit het ei gekomen waren. Meestal bleken zij tot dit laatste niet in staat en moesten daarbij geholpen worden.

Ook Freyse en Müller (1962) toonden parthenogenese aan bij *Lacerta saxicola armeniaca* Méhely. Zij isoleerden zeven vrouwtjes, die zij in de zomer van 1959 van Darevsky hadden gekregen, in het laboratorium. Na de overwintering legden zes dieren elk drie tot zes eieren. Uit vier eieren van het eerste broedsel werden, voor histologisch onderzoek, twee levende – nagenoeg volgroeide – embryo's geïsoleerd terwijl de andere twee kort voor de isolatie waren doodgegaan. Dat er zo weinig eieren uitkwamen weten Freyse en Muller aan de (kennelijk) onvoldoende incubatie – omstandigheden.

Peters (1953) blijkt zeer onder de indruk te zijn van het werk van Darevsky. In een samenvatting van dit onderzoek omschrijft hij het werk als: "einer zoölogischen Entdeckung, die man wohl ohne Uebertreibung zu den Bemerkenswertesten unseres Jahrhunderts zählen darf."

Dezelfde auteurs (Darevsky en Kulikova, 1964) beschrijven drie jaar later de cytologie van een bastaard – populatie, die is ontstaan uit hybridisatie tussen de twee eerder genoemde parthenogenetische en tweeslachtige soorten *Lacerta saxicola armeniaca* en *Lacerta saxicola terentjevi*. Onder tweeslachtige soorten worden soorten verstaan, waarin zowel vrouwelijke als mannelijke dieren voorkomen. In totaal werden negen volwassen in de natuur gevangen bastaarden onderzocht en vier, nog geen een jaar oude, bastaarden, die in het laboratorium uit geïncubeerde eieren waren verkregen. De chromosoom – aantallen van de bastaarden en de oudersoorten werden bepaald: ( $2n =$ ) 38 voor de diploïde parthenogenetische moeders. ( $2n =$ ) 38 voor de diploïde tweeslachtige vaders en ( $3n =$ ) 57 voor de triploïde bastaarden.

Hoewel de parthenogenetische wijze van voortplanten bij de drie *Lacerta saxicola* ondersoorten overduidelijk is aangetoond, is Dobrowolska (1964) van mening, dat zij in de, in alcohol gepreserveerde, collectie van Darevsky één mannetje heeft gevonden. Dat er histologisch geen spermatogenese aangetoond kon worden komt doordat het dier op 21 September (1955) was gevangen – een jaargetijde, waarin geen spermatogenese plaatsvindt. Wel werden, naast de goed ontwikkelde testes, ook "nauwelijks zichtbare" oviducten waargenomen. Op grond hiervan is het dus juist om over een hermafrodiet exemplaar te spreken in plaats van "an adult male appearance".

Darevsky, Kupriyanova en Bakradze (1977, 1978) bepalen het aantal hermafrodieten en mannelijke nakomelingen van parthenogenetische soorten van het *Lacerta* genus op 0,1%. Het diploïde chromosomenpaar van de twee

onderzochte exemplaren verschilde ten opzichte van dat van de vrouwtjes van dezelfde soort door de aanwezigheid van één paar heteromorfe chromosomen, waarschijnlijk de geslachtschromosomen. De vruchtbaarheid van deze mannetjes achtten Darevsky et al. indirect aangetoond door het in de natuur voorkomen van hybriden van de sympatrisch levende parthenogenetische soorten *Lacerta armeniaca* en *Lacerta dahli*.

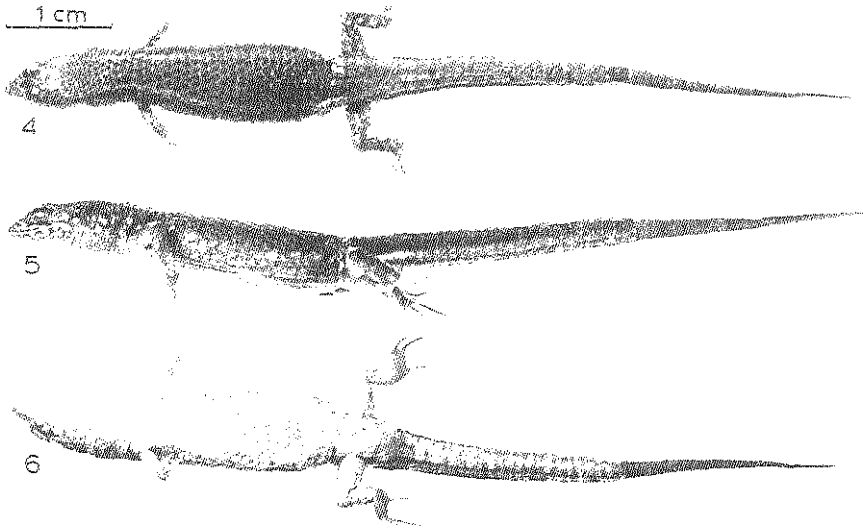
Met Danielyan beschrijft Darevsky (Darevsky en Danielyan, 1968; 1969) zowel diploïde als triploïde nakomelingen van kruisingen tussen de twee parthenogenetische vormen ( *Lacerta saxicola armeniaca* Méhely en *Lacerta unisexualis* Darevsky ) en de tweeslachtige *Lacerta saxicola valentini* Boettger. In een oviduct worden zowel diploïde als triploïde eieren gevonden; slechts een bepaald gedeelte van de zich parthenogenetisch ontwikkelende eieren wordt dus bevrucht! De kruisingen werden mogelijk gemaakt door het creëren van een verspreidingsgebied, waarin twee soorten voorkomen. Daartoe werden 62 volwassen *Lacerta saxicola valentini* in April gevangen en elders, in natuurlijk geïsoleerde populaties *Lacerta armeniaca* en *Lacerta unisexualis* losgelaten. Medio Juni, ongeveer twee weken voor het eierenleggen, werden vrouwtjes in de twee gescheiden verspreidingsgebieden gevangen : 21 bevruchte *Lacerta unisexualis* en 15 *Lacerta armeniaca* vrouwtjes. Tevens werden 30 onbevruchte vrouwtjes van beide soorten gevangen om als controle – groepen dienst te doen. De legsels werden strikt gescheiden in het laboratorium geïncubeerd. De triploïde nakomelingen (L.u. 40% en L.a. 44%) bleken steriel te zijn. Ook bleken de triploïde dieren groter te zijn dan de diploïde.

Danielyan (1971) constateerde, dat zowel tweeslachtige als parthenogenetische vrouwelijke vormen met veranderende seizoenen naar een ander habitat migreren. Alle sexueel gerijpte individuen van beide vormen hebben een eigen woongebied, hetwelk meestal enige overlap vertoont met dat van andere individuen door de hoge populatiedichtheid. Tijdens de broedtijd overlappen de woongebieden van de mannetjes echter niet de woongebieden van de vrouwtjes.

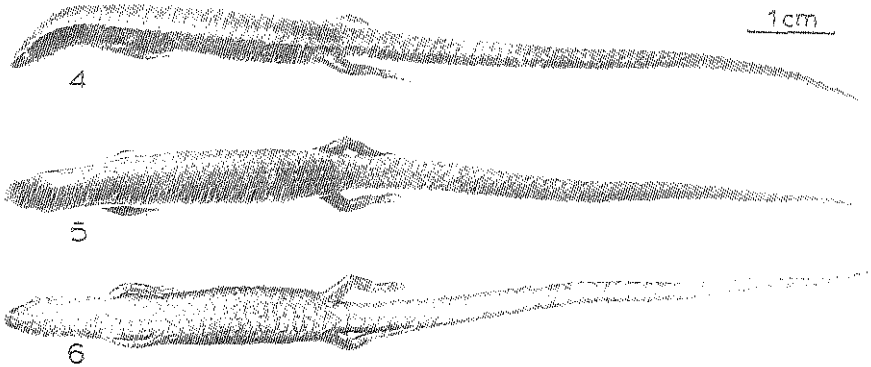
Uit een studie van een populatie parthenogenetische hagedissen van het subgenus *Archaeolacerta*, die in de jaren 1967 – 1970 in verschillende provincies van Turkije was verzameld, bleek dat er in een bepaald verspreidingsgebied zeer weinig dieren gevangen waren. Van dit geringe aantal, slechts vier dieren, bleken er twee van het mannelijk geslacht te zijn! Tot die tijd was er pas één mannetje gevonden onder de meer dan 1000 onderzochte *Lacerta armeniaca* exemplaren (Darevsky, 1966). Hoewel een aantal van vier exemplaren uiteraard veel te klein is om verstrekkende conclusies te trekken, lijkt het theoretisch denkbaar (aldus Darevsky), dat deze populatie een voorbeeld is van geografische parthenogenese.

Uzzell (1972) verrichtte elektroforese – studies van negen enzymen van verschillende soorten van het *Lacerta saxicola* complex en kwam tot de slotsom, dat





Dorsale, laterale en ventrale aanzicht van *Leposoma percarinatum*.  
 (Uit: Hoogmoed, 1973).



Dorsale, laterale en ventrale aanzicht van *Gymnophthalmus underwoodi* Grant.  
 (Uit: Hoogmoed, 1973).

de éénslachtige *Lacerta*'s door hybridisatie zijn ontstaan, doch dat de *Lacerta mixta* op grond van de biochemische gegevens waarschijnlijk geen hybride is. Dit in tegenstelling tot het vermoeden van Lantz & Cyren ( 1936 ), die veronderstelden, dat *Lacerta mixta* als hybride van *Lacerta derjugini* en *Lacerta saxicola* was ontstaan.

Samen met Darevsky verrichtte Uzzell verder onderzoek naar de vermoede hybride afkomst van *Lacerta mixta* (Uzzell & Darevsky, 1973). Ook nu werden elektroforese – studies verricht, doch ditmaal aan vijf enzymen van *Lacerta mixta*, *Lacerta saxicola parvula* en *Lacerta derjugini*. Uzzell en Darevsky kwamen tot de conclusie, dat *Lacerta mixta* geen hybride oorsprong heeft, maar zij sluiten niet uit, dat er een parthenogenetische ondersoort tussen de *Lacerta mixta* verborgen is. In dat geval behoort deze vorm echter niet tot de *Lacerta mixta* gerekend te worden want deze soort heeft een gelijke geslachtsverhouding in het veld en het holotype van *Lacerta mixta* zelf is een mannetje.

Biochemische bewijzen voor de hybride oorsprong van de parthenogenetische soorten van het *Lacerta saxicola* complex werden door Uzzell en Darevsky (1974, 1975) geleverd. Zij verrichtten een uitgebreid elektroforese – onderzoek aan vijf eiwitten van zes – aan *Lacerta saxicola* verwante – tweeslachtige soorten ( *Lacerta valentini*, *Lacerta portschinskii*, *Lacerta raddei raddei*, *Lacerta raddei nairensis*, *Lacerta mixta* en *Lacerta parvula* ) en vier éénslachtige soorten ( *Lacerta armeniaca*, *Lacerta dahli*, *Lacerta rostombekovi* en *Lacerta unisexualis* ). Geconcludeerd werd, dat *Lacerta armeniaca* ontstaan is door hybridisatie van *Lacerta valentini* en *Lacerta mixta*. *Lacerta unisexualis* van *Lacerta valentini* en *Lacerta raddei nairensis*. *Lacerta rostombekovi* van *Lacerta raddei raddei* en *Lacerta portschinskii* en tenslotte *Lacerta dahli* van *Lacerta portschinskii* en *Lacerta mixta*. Bovendien bleek uit veldstudies, dat elk van de parthenogenetische soorten, voor wat betreft de hoogte – verdelingen, de vegetatie en de geografische verdeling, precies de intermediair was van de veronderstelde oudersoorten (Uzzell & Darevsky, 1975).

Behalve deze Oost – Europese onderzoeken en waarnemingen van vertegenwoordigers van het genus *Lacerta* (die tot de hagedissen van de Oude Wereld behoren), zijn er eveneens in grote lijnen soortgelijke, doch meer uitgebreide studies gemaakt van hagedissen, die soortgenoten uit de Nieuwe Wereld vertegenwoordigen. Het betreft hier soorten van het genus *Cnemidophorus*.

## II – 4.2.2 Xantusiidae: Nachthagedissen

Telford & Campbell (1970) beschreven een éénslachtige nachthagedis, die in Panama voorkomt : *Lepidophyma flavimaculatum* (XANTUSIDAE). Tijdens een ecologische studie in Centraal Panama stuiten zij "per ongeluk" op deze

hagedissensoort. Aangezien er nog zeer weinig over de voortplanting bekend was, werd besloten deze populatie op een regelmatige wijze te verzamelen. Gedurende anderhalf jaar werden totaal 46 exemplaren gevangen, die in het laboratorium vijf jongen voortbrachten en één volgroeid embryo. Alle dieren bleken van het vrouwelijk geslacht te zijn. Hoewel de auteurs de theoretische mogelijkheid niet geheel uitsluiten, dat deze waarnemingen veroorzaakt kunnen worden doordat de mannetjes in een extreem laag ratio voorkomen of een sterk afwijkend micro – habitat kiezen, menen zij toch te mogen concluderen, dat het hier zeer waarschijnlijk een éénslachtige, en dus parthenogenetische, soort betreft. Temeer, daar alle bekende geslachtsverhoudingen bij andere *Xantusia* hagedissen normaal ( 1 : 1 ) zijn: *Xantusia vigilis* ( Zweifel & Lowe, 1966 ), *Xantusia henshawi* en *Klauberina riversiana* ( Telford & Campbell, 1970 ). Ook zijn er geen studies bekend, die geslachtsverschillen aantonen bij de keuze van het micro – habitat.

In de hoop nieuwe gegevens te vinden omtrent de fylogenetische relaties binnen de kleine, maar systematisch nog verwarring wekkende, XANTUSIIDAE familie verrichtte Bezy (1972) onderzoek naar de karyotypische verschillen. Hij vindt geen bewijzen voor de hybride oorsprong van de parthenogenetische *Lepidophyma flavimaculatum*, noch cytogenetische noch morfologische, terwijl er geen plausibele oudersoorten in de verspreidingsgebieden bekend zijn. In 1973 beschrijft Smith ( 1973 ) drie nieuwe *Lepidophyma* taxa uit Mexico. Tevens herzielt hij de gehele indeling van het genus *Lepidophyma*, stelt een determineer – tabel op en beschrijft de dan bekende geslachtsverhoudingen van de verschillende soorten van dit genus. Uit de laatste gegevens concludeert Smith, dat er slechts één soort is, dat zich op parthenogenetische wijze voortplant: *Lepidophyma obscurum*. Dit is een Panamese soort uit de regio rond de Rio Chili – brillo, dat door Smith op grond van de afwijkende wijze van voortplanting als apart genus wordt erkend en overeenkomt met de door Telford & Campbell ( 1970 ) beschreven soort ; toen onder de naam *Lacerta flavimaculatum* Duméril.

## II – 4.2.3 Teiidae: Hagedissen van de "Nieuwe Wereld

### II – 4.2.3.1 *Gymnophthalmus underwoodi*

Grant (1958) beschreef een serie van 14 op Barbados gevangen hagedissen. Het betrof hier exemplaren van de kleine skink ( *Gymnophthalmus Underwoodi* ), een hagedis van ca. 45 mm lengte in volwassen stadium. In deze beschrijvingen wijst Grant op het feit, dat alle dieren de typisch mannelijke poriën in de huidschalen rond de achterste bovenpoten missen. Grant vroeg zich dan ook af of hij uitsluitend vrouwtjes had gevangen of dat er mannetjes waren, die deze specifieke eigenschappen niet hadden. Nadat Underwood (1962) deze soort ook op Trinidad had gesignaleerd, onderzocht Thomas (1965) 21 exemplaren van Trinidad en meer

dan 40 extra exemplaren van Barbados. Ook Thomas vond bij geen enkel dier bovengenoemd specifiek mannelijk kenmerk en hij concludeerde dan ook: "It seems likely that *Gymnophthalmus Underwoodi* can be added to the list of lizards (most teids) having unisexual populations.

Later worden, eveneens uitsluitend vrouwelijke exemplaren van deze soort in Suriname waargenomen en beschreven (Hoogmoed, 1973).

#### II – 4.2.3.2 *Leposoma percarinatum*

Uzzell en Barry (1971) onderscheidden twee verschillende *Leposoma* populaties in de hooglanden van Guyana: *L. percarinatum* en *L. guianense*. Uzzell beschreef onder andere verschillen in de huidschalen (afmetingen, aantal en patronen), de kleurpatronen en de geslachtsverhoudingen. Van de 17 *L. guianense* exemplaren, waren er 7 mannetjes en 10 vrouwtjes, terwijl er tussen de 30 *L. percarinatum* niet één mannetje zat. Op grond van de geografische verspreiding van deze twee populaties en die van *L. parietale* (een soort uit het Amazone-gebied) en de morfologische kenmerken van deze drie soorten concluderen Uzzell en Barry: "It seems likely that *L. parietale* en *L. guianense* hybridized to give rise to *L. percarinatum*.

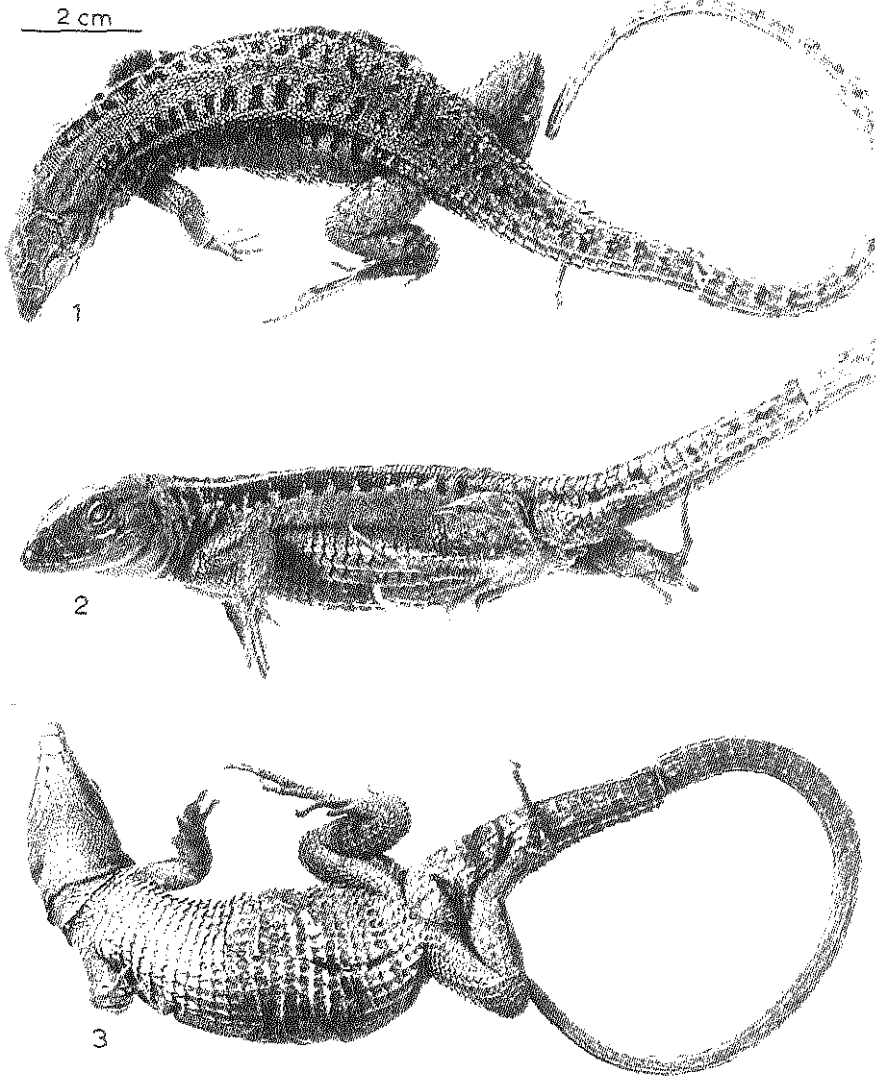
Ook door Hoogmoed (1973) worden uitsluitend (18) vrouwtjes beschreven in een collectie afkomstig uit Suriname en Guiana. Deze soort wordt als éénslachtig aangeduid.

#### II – 4.2.3.3 *Kentropyx borckianus*

Naast de reeds eerder genoemde soorten *Gymnophthalmus underwoodi* en *Leposoma percarinatum* heeft Hoogmoed (1973) nog een derde éénslachtige soort beschreven, *Kentropyx borckianus*: "This is another parthenogenetic species. No males of this species are known. Only mature females, some of them pregnant, are known in museum collections". De soort is alleen waargenomen in Suriname, Brits en Frans Guyana, Venezuela, Trinidad en Barbados, en is langer dan de twee andere bovengenoemde parthenogenetische soorten: ca. 100 mm in het volwassen stadium.

#### II – 4.2.3.4 *Cnemidophorus*

Verreweg het grootste aantal parthenogenetische soorten is bij het genus *Cnemidophorus* beschreven.



Dorsale, laterale en ventrale aanzicht van *Kentropyx borckianus*.  
(Uit: Hoogmoed, 1973).

Milstead (1957 – A; 1957 – B) verrichtte uitgebreid onderzoek naar de verschillende aspecten van competitie tussen vier sympatisch levende *Cnemidophorus* soorten (waaronder de *Cnemidophorus tessellatus*) en kwam tot de conclusie, dat het enige verschil tussen de soorten de reactie op de verschillende temperaturen was. Hoewel de voortplanting ook bestudeerd werd door Milstead blijkt hij de parthenogenetische wijze van voortplanten van *Cnemidophorus tessellatus* in het geheel niet waargenomen te hebben. De eerste aanwijzing in die richting werd een jaar later gegeven. In een overzichtsartikel over de reptielenfauna van het "Big Bend" gebied in Texas wijst Minton (1958) op het feit, dat er geen mannetjes voorkomen bij de hagedissoort *Cnemidophorus tessellatus*: "All specimens are females. I have never seen a male of this species from any part of the range". Een jaar later wordt door Tinkle (1959) dezelfde waarneming gedaan in een groot verspreidingsgebied in West Texas. Het bleek, dat er twee populaties *C. tessellatus* voorkwamen in resp. Noord- en Zuidwest Texas. Deze twee verspreidingsgebieden zijn meer dan 500 km. van elkaar gescheiden. "The most remarkable aspect of the biology of these lizards is the apparent absence of males in the populations.... No explanation is advanced for the absence of males because it is felt that continued collecting of large series from all seasons will reveal the presence of males. In a series of 65 specimens, however, one should expect to find some males, particularly because these specimens are from several different months, so that sampling errors would not seem to account for the absence of males....". Tinkle twijfelt dus kennelijk of het ontbreken van mannetjes een biologisch fenomeen is of dat de waarneming berust op een te klein aantal verzamelde en onderzochte exemplaren!

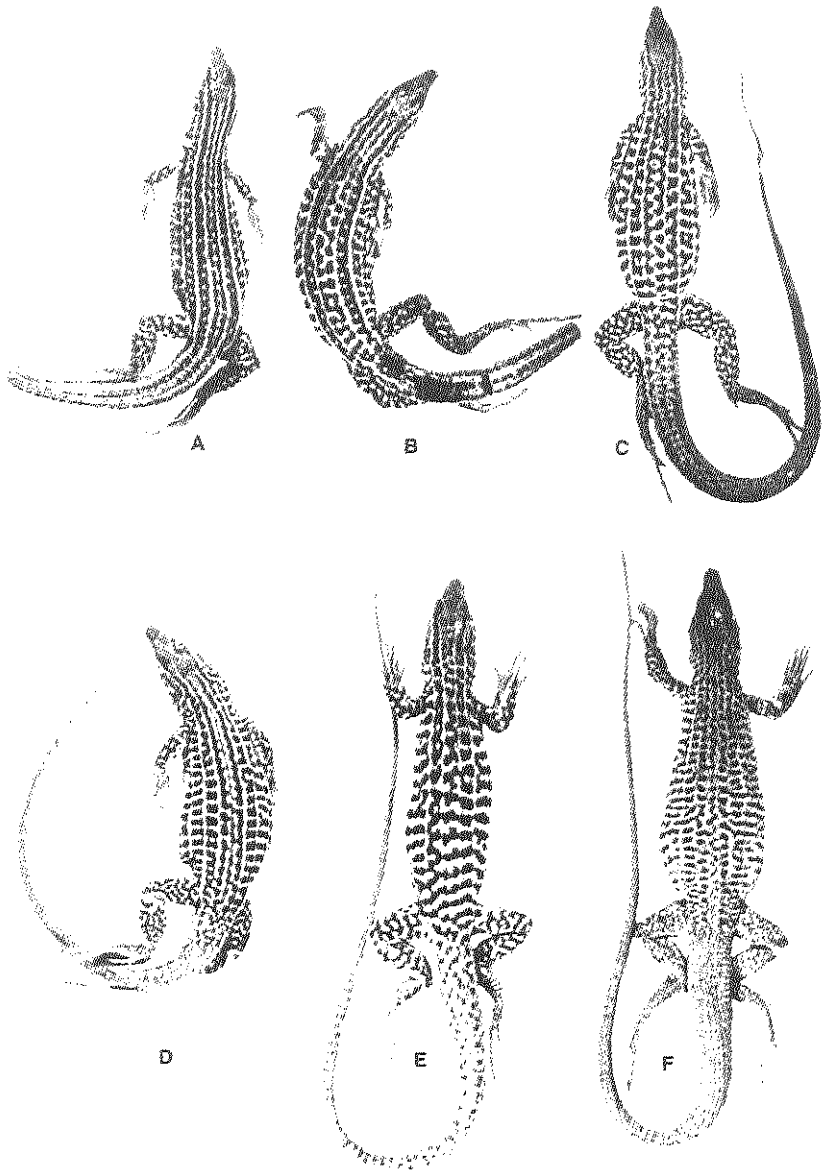
Maslin (1962) beschreef zes geheel (of nagenoeg geheel) uit vrouwtjes bestaande soorten ("subsoorten of populaties") van het genus *Cnemidophorus*. Deze soorten waren: *C. costatus exsanguis* Lowe, *C. depei cozumelus* Gadow, *C. inornatus* Baird, *C. velox* Springer, *C. perplexus* Baird & Girard en *C. tessellatus* (Say). Hoewel Maslin ervoor waarschuwde om niet te snel de hypothese van parthenogenese te aanvaarden was hij er wel van overtuigd, dat de extreme geslachtsratio's een genetische achtergrond hadden en niet door ecologische, ethologische of fysiologische verschillen verklaard konden worden.

In hetzelfde jaar publiceerde Maslin samen met McCoy het resultaat van een studie van 294 nieuw gevangen exemplaren van *C. depei cozumelus*: alle onderzochte exemplaren waren vrouwtjes. Hoewel er op ruime schaal geschreven wordt over parthenogenetische *Cnemidophorus* soorten is er tot 1966 eigenlijk nog geen enkel direct bewijs geleverd, dat de veronderstelde parthenogenetische *Cnemidophorus* soorten inderdaad parthenogenetisch zijn. Slechts een indirect bewijs (men vond alleen maar vrouwelijke exemplaren van de betreffende soorten) was tot nu toe

geleverd. Een aanzienlijke verbetering in deze toch onbevredigende situatie werd door Maslin (1966, 1967) aangebracht. In 1966 verzamelde en incubeerde Maslin (1966) eieren van *C. exsanguis*, *C. neomexicanus*, *C. tessellatus*, *C. velox* en *C. uniparens* in het laboratorium. Alle nakomelingen bleken vrouwelijke exemplaren te zijn. Een nog overtuigender bewijs leverde Maslin (1967) een jaar later toen hij de resultaten publiceerde van huidtransplantaties; een techniek, die reeds eerder door onder andere Kallman (1962) was gehanteerd om het gynogenetische karakter van *Poecilia formosa* aan te tonen.

Het enig juiste en afdoende bewijs zou echter moeten bestaan uit het in strikte afwezigheid van mannetjes laten opgroeien van juist uitgekomen eieren en het nagaan of deze individuen zelf levende jongen voortbrengen, die bij voorkeur ook weer levensvatbare eieren zouden moeten leggen. Resultaten van een dergelijk onderzoek, zij het op zeer kleine schaal, worden pas in 1971 door Maslin (1971) gepubliceerd. In de periode 1960 – 1968 legden vrouwtjes van 3 "veronderstelde" parthenogenetische soorten (*C. neomexicanus*, *C. tessellatus* en *C. uniparens*) meer dan 1200 eieren in het laboratorium van Maslin. Uit alle uitgekomen eieren kwamen vrouwtjes. Slechts weinige van deze dieren groeiden uit tot volwassen vrouwtjes; nog minder vrouwtjes legden eieren. Dit laatste werd bij slechts negen exemplaren waargenomen (1 *C. tessellatus*, 1 *C. neomexicanus* en 7 *C. uniparens*). Deze vrouwtjes legden resp. 4, 2 en de groep van zeven totaal 23 eieren. Het *C. tessellatus* exemplaar legde tussen 2 en 4 Juli 1965 vier eieren, waarvan er drie werden beschadigd tijdens een "demonstratie" het vierde kwam op 12 September 1965 uit. Dit exemplaar legde op 19 Maart 1966 zelf twee eieren; één ei werd tevergeefs geïncubeerd en vertoonde later na inspectie geen enkel weefsel. In het gefixeerde ei bleek de parthenogenetische embryogenese echter reeds duidelijk herkenbaar aanwezig. Het *C. neomexicanus* exemplaar legde op 27 Januari 1967 twee eieren: één ging dood toen het embryo – ei op punt van uitkomen stond; het andere kwam op 23 Maart 1967 uit. Dit dier legde vervolgens zelf op 22 Mei 1968 vier eieren, waarvan er zich twee niet verder ontwikkelden. De andere twee werden geïncubeerd, doch kwamen niet uit. Na het openen van deze eieren bleken goed ontwikkelde embryo's gevormd te zijn. Het grootste succes werd echter verkregen bij zeven in het laboratorium opgegroeide *C. uniparens* vrouwtjes, die acht broedsels met totaal 23 eieren legden. Van deze 23 eieren werden er 19 geïncubeerd, waarvan er drie uitkwamen, terwijl de overige eieren alle een parthenogenetische ontwikkeling vertoonden; sommige zelfs tot het geboortestadium. Met deze experimenten is het voorkomen van parthenogenese onweerlegbaar bewezen. Het is jammer, dat Maslin geen eieren van diploïde tweeslachtige vrouwtjes als controles in de experimenten meenam. Op die manier zou een indruk verkregen kunnen worden in hoeverre het relatief grote sterftepercentage het gevolg is van minder goede kweek – omstandigheden of zou kunnen blijken, dat zich parthenogenetisch ontwikkelende eieren minder levensvatbaar zijn!

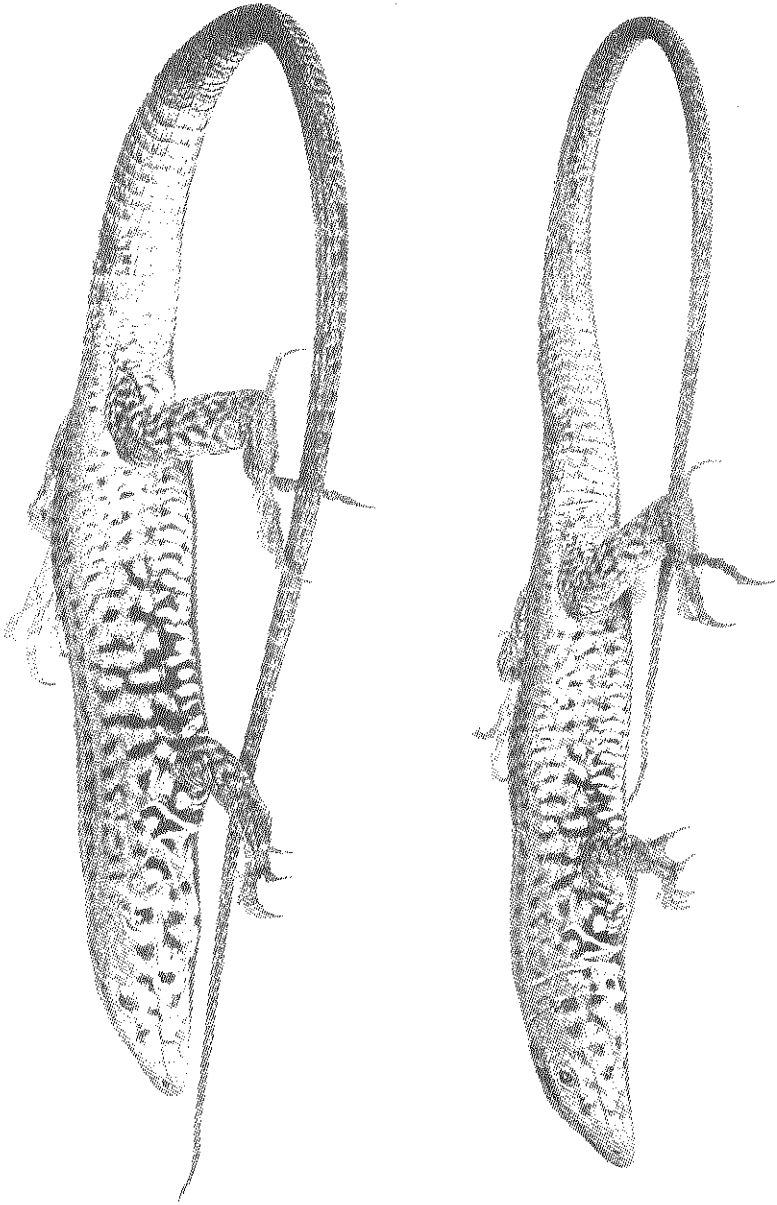
In 1952 hadden Lowe & Wright (1952) reeds een nieuwe soort van het genus



Zes biotypen *Cnemidophorus tessellatus*.  
(Uit: Zweifel, 1965).



*Cnemidophorus tessellatus tessellatus*  
(Lit: Van Denburg, 1922).



*Cnemidophorus* beschreven : *C. neomexicanus* . Met behulp van een gedetailleerde studie van het karyotype toonden zij (Lowe & Wright, 1966) later aan, dat deze parthenogenetische soort diploïd is en de genen bevat van twee tweeslachtige soorten, welke nog steeds sympatrisch voorkomen, te weten *C. tigris* Baird en Girard en *C. inornatus* Baird. *Cnemidophorus neomexicanus* is dus ontstaan door natuurlijke hybridisatie van *C. tigris* en *C. inornatus* .

Ook Neaves & Gerald (1968) kwamen later op grond van elektroforese – studies van homogenaten van hart – , lever – en spierweefsel en de daaruit verkregen patronen van lactaat – dehydrogenase iso – enzymen van drie tweeslachtige en vier parthenogenetische soorten tot eenzelfde conclusie. Behalve voor *C. neomexicanus* werd dit eveneens aangetoond voor *C. tessellatus* (Neaves & Gerald, 1968, 1969), waarbij het triploïde karakter van twee typen en het diploïde karakter van vier andere typen tot uiting kwam in de intensiteit van de verschillende banden. De genetische variatie in *C. tessellatus* populaties is het onderwerp van een studie van Parker & Selander (1976). Zij onderzochten de genetische diversiteit in de parthenogenetische *C. tessellatus*. Zoals bekend (Lowe & Wright, 1966) bestaat *C. tessellatus* uit diploïde ( *C. tigris* x *C. septemvittatus* hybriden ) en triploïde ( diploïde *C. tessellatus* x *C. sexlineatus* ) populaties. De genetische variabiliteit werd bepaald door gel – elektroforesestudies van hart – , lever – , nier – en staartspierhomogenaten, waarbij de iso – enzymvariatie, gecodeerd door 21 loci werd bepaald. De analyse was gebaseerd op 3 *septemvittatus* – , 2 *tigris* – , 2 *sexlineatus* – en 27 *tessellatus* populaties. Deze populaties omvatten resp. 62, 69, 34 en 406 (339 diploïde en 67 triploïde) dieren. Uit de elektroforese – patronen bleek, dat de individuele heterozygositeit in *tessellatus* veel hoger is (0.560 in diploïden en 0.714 in triploïden) dan in de tweeslachtige oudersoorten (gemiddeld 0,059). Deze hoge waarden zijn in overeenstemming met de gegevens van Uzzell & Darevsky (1975) voor de parthenogenetische *Lacerta* hagedissen en met de gegevens van Vrijenhoek, Angus & Schultz (1976) voor de hybridogenetische vissen ( *Poeciliopsis* ) en bewijzen eens te meer, dat een hoge mate van heterozygositeit karakteristiek is voor hybride éénslachtige soorten. Alle triploïde individuen vormden kennelijk één kloon; bij de diploïde dieren werden twaalf klonen geïdentificeerd; in iedere populatie werden 1 tot 4 klonen gevonden. Uit dit relatief beperkte aantal klonen concluderen Parker & Selander (1976), dat *C. tessellatus* waarschijnlijk recent is ontstaan, terwijl zij de evolutionele potentie van *tessellatus* en van parthenogenetische vormen minder sterk beperkt achten dan in het algemeen werd verondersteld.

De diversiteit binnen en tussen de, geografisch gescheiden, voorkomende parthenogenetische populaties hangt in sterke mate af van het optreden van mutaties en recombinaties en houdt waarschijnlijk daarom nauw verband met de ouderdom van de parthenogenetische vorm (White, 1970). De leeftijd van de *tessellatus* populaties is onbekend, doch zij zijn mogelijk minder dan 200 jaar

geleden ontstaan toen door overbegrazing van het prairie – gras de oudersoorten mogelijk pas voor het eerst met elkaar in contact kwamen.

Door Lowe & Wright (1966) wordt een hypothese gepostuleerd over het ontstaan van de triploïde parthenogenetische *Cnemidophorus* – soorten: na hybridisatie van twee tweeslachtige soorten ontstaat een parthenogenetische diploïde soort welke na terugkruising met een (of beide) van de oorspronkelijk tweeslachtige oudersoorten het allotriploïde stadium bereikt. Een jaar later beschrijft Wright ( 1967 ) een nieuwe eenslachtige soort : *C. opatae*. De nieuwe soort lijkt het meest op *C. uniparens*. Voor het verklaren van de verschillende hybridisatie – theorieën zouden veldstudies ten aanzien van de verschillende habitats, het verschuiven van niches en dergelijke van groot belang kunnen zijn. Het is dan ook niet verwonderlijk, dat er een aantal artikelen over deze onderwerpen verschijnen.

Medica (1967) verrichtte een uitgebreide studie naar de eetgewoonten, habitatvoorkeur, voortplanting en dag – nacht activiteiten bij 608 hagedissen uit vier sympatrische *Cnemidophorus* soorten in zuid – centraal Nieuw Mexico. Hieruit bleek onder andere dat *C. exsanguis* en *C. inornatus* beide eenzelfde habitat – voorkeur hebben voor een meer vochtig gebied, terwijl *C. neomexicanus* en *C. tigris* beide een meer droog gebied prefereren. De broedseizoenen komen met elkaar overeen; alleen dat van *C. exsanguis* was aanzienlijk korter. In de seizoens – en dag – activiteiten waren weinig verschillen te constateren. Conclusies ten aanzien van migratie en populatie – dichtheden waren niet te trekken, enerzijds doordat de vangst gedurende het eerste jaar een sterke invloed had op de betreffende populatie en anderzijds doordat de migratie en populatiesamenstellingen slechts twee jaren daarna zijn vervolgd, jaren die bovendien in meteorologisch opzicht extreem veel verschilden. Wel was duidelijk, dat regen een invloed had op het totale voedsel – aanbod en de voedselvoorkeuren. Een opvallend verschil in de voortplanting vertoonde *C. exanguis* ten opzichte van de drie andere soorten; eerstgenoemde legde slechts een broedsel per seizoen; de andere drie soorten twee; het aantal eieren per broedsel was in alle gevallen ongeveer gelijk. Ook werden aanzienlijke verschillen in voedingsgewoonten gevonden tussen *C. inornatus* en *C. exsanguis*; mogelijk is dit een van de redenen waarom beide soorten sympatrisch kunnen leven zonder ernstige concurrentie. Deze voedingsverschillen werden niet tussen *C. tigris* en *C. neomexicanus* gevonden ; deze concurrentie – factor zou een reden kunnen zijn waarom *C. neomexicanus* zo'n uiterst beperkt verspreidingsgebied heeft, aldus Medica.

Een andere vergelijkende studie betrof een onderzoek naar de habitats van de negen parthenogenetische soorten van *Cnemidophorus* door Wright & Lowe ( 1968 ). Zij wijzen erop, dat *C. cozumelus* een sterk contrast vertoont met de andere acht soorten, die allen weliswaar verschillende habitats hebben, doch in gebieden met gemeenschappelijke eigenschappen leven. Deze gemeenschappelijke kenmerken van de habitats worden omschreven als "extreem marginaal, voor altijd verstoord,

randgebied, overgangsgebied". "Het belang van de beschikbaarheid van een dergelijk habitat voor de nieuwgevormde allopoloïde parthenogenetische vorm is van doorslaggevende betekenis", aldus Wright & Lowe (1968). Door Christiansen (1971) werd de voortplanting bij de tweeslachtige *C. inornatus* en de hiermede nauw verwante, sympatrische, parthenogenetische *C. neomexicanus* onderzocht teneinde inzicht te verkrijgen in de mogelijke voor- en nadelen van parthenogenese ten opzichte van een tweeslachtige soort in elkaar beconcurrerende populaties. Hoewel het aantal limiterende factoren voor een populatie waarschijnlijk zeer talrijk is, beschouwde Christiansen er bewust slechts enkele. Hij concludeerde, dat de beide species verschillende oecologische voorkeuren hebben, welke de soortverspreiding van de ene bevordert ten koste van de andere en dat de jaarcyclus van activiteiten en winterslaap gelijk is: volwassen dieren beginnen de winterslaap in de derde week van September en ontwaken half April. Tevens concludeerde hij, dat de voortplantingscyclus van de vrouwtjes van beide soorten nagenoeg identiek is: in het begin van de lente (April of Mei) begint de cyclus met de groei van 1-3 follikels; deze groei gaat gedurende circa 23 dagen door tot de ovulaties in de laatste week van Mei of de eerste week van Juni.

Recent vatte Cuellar (1979) de literatuur samen, waarin alle gevallen van sympatrisch levende *Cnemidophorus* soorten werden beschreven. Sommige interacties worden op basis van enige jaren veldstudie gedetailleerd besproken terwijl bovendien verslag wordt gedaan van een eerste experimentele veldstudie, die tot doel had de ecologische relaties van de sympatrische levenswijze bij zeven *Cnemidophorus* soorten te onderzoeken. Cuellar concludeert, dat een voorkeur voor een speciaal habitat zeer waarschijnlijk de doorslaggevende factor is en dat de habitatverdeling geen gevolg is van een actieve competitie tussen de twee soorten.

Analyse van twee natuurlijke hybriden van de parthenogenetische *C. sonorae* en de tweeslachtige *C. tigris* wees uit, dat de hybriden sterk op de moeder leken (Lowe et al., 1970 - A). Uit studies van de karyotypen blijkt, dat de hybriden tetraploïd zijn: een triploïde bijdrage van de moedersoort en een haploïde bijdrage van de vadersoort. Deze waarneming is met name van belang voor een mogelijke toekomstige evolutie van polyploïde tweeslachtige *Cnemidophorus* soorten. De volgende karakteristieken van de tetraploïden worden vermeld:

- 1) allotetraploïde individuen kunnen goed levensvatbaar zijn en zich met succes handhaven;
- 2) beide geslachten kunnen waarschijnlijk voorkomen (in het artikel worden echter alleen twee mannetjes beschreven);
- 3) allotetraploïde cellen zouden de meiose kunnen ondergaan.

Eveneens op basis van chromosoomgegevens delen Lowe et al. (1970 - B) het complexe genus *Cnemidophorus* in vijf soortgroepen in: *deppei*, *lemniscatus*, *sexlineatus*, *tigris* en *tesselatus*. Behalve aan de hand van chromosoomkarakteristieken zijn de groepen eveneens in grote lijnen te

onderscheiden op basis van de externe morfologie. De tessellatusgroep omvat twee parthenogenetische soorten: *tesselatus* en *neomexicanus*; beide ontstaan door hybridisatie tussen individuen uit dezelfde twee soortgroepen, maar met verschillende oorspronkelijke oudercombinaties. De vijf bovengenoemde soortgroepen bevatten respectievelijk 4 ( $2n = 52$ ), 3 ( $2n = 50$ ), 21 ( $2n = 46$ ), 1 ( $2n = 46$ ) en 2 ( $2n = 46$ ) soorten. Tussen deze soortgroepen bevinden zich respectievelijk 1 (*C. deppei cozumelus*), geen, 6 (*C. exsanguis*, *C. flagellicandus*, *C. opatae*, *C. sonorae*, *C. uniparens* en *C. velox*), geen en 2 (*C. tessellatus* en *C. neomexicanus*) parthenogenetische soorten. In de vijf soortgroepen worden totaal 31 soorten onderscheiden, waarvan er 9 parthenogenetisch zijn.

Behalve een nieuwe indeling van het parthenogenetische "*C. cozumela complex*" maakt Fritts (1969) ook melding van de vangst van twee mannetjes, die tot dit complex behoren. Op grond van morfologische kenmerken neemt Fritts aan, dat het waarschijnlijk triploïde hybriden zijn, ontstaan door een terugkruising van een allodiploïde *C. cozumela* vrouwtje met een *C. augusticeps* mannetje. Deze mannetjes verschillen echter van het reeds eerder beschreven *Lacerta* mannetje (Darevsky, 1966) doordat zij geen "hermafroditachtige structuren" bezitten (Taylor et al., 1967).

Door middel van gel – elektroforese van homogenaten van de lever toonde Neaves (1969) aan, dat vier tweeslachtige *Cnemidophorus* – soorten uit de *C. sexlineatus* groep verschillende typen adenosinediaminase (ADA) bezitten. Een vijfde tweeslachtige soort, *C. tigris*, heeft eenzelfde ADA – type als een soort van de *C. sexlineatus* groep, maar is op grond van andere genetische en biochemische kenmerken duidelijk hiervan te onderscheiden. Door kennis van de ADA – typen kan men dus de vijf soorten, waarvan men vermoedt dat zij betrokken zijn geweest bij de hybridisaties tussen soorten, welke resulteerden in het ontstaan van parthenogenetische *Cnemidophorus* – soorten, onderscheiden.

Het eerste onderzoek naar de oögenese bij een parthenogenetische *Cnemidophorus* – soort wordt in 1971 gepubliceerd door Cuellar (1971) en is verricht bij *C. uniparens*. Op grond van zijn waarnemingen (twee rijpingsdelingen, die beide poollichaampjes vormen; de dyade – structuur van de chromosomen en het triploïde aantal van 69 van het eerste poollichaampje en de dyade – chromosomen in de metafase II, eveneens "ongeveer" het triploïde aantal) concludeert Cuellar, dat de parthenogenese bij deze hagedissen van het "meiotische type" is, dat wil zeggen er vindt een normale meiose plaats. Bovendien wordt het somatische aantal chromosomen vroeg in de oögenese verdubbeld, waarschijnlijk door een pre – meiotische endo – duplicatie; het triploïde niveau wordt vervolgens met behulp van twee rijpingsdelingen hersteld. De levensvatbaarheid van *C. neomexicanus* eieren is waarschijnlijk de helft van die van *C. inornatus* eieren, waardoor de voortplantingspotentie van beide soorten gelijk is. Het agressieve gedrag van *C. neomexicanus*, zijn voorkeur voor verstoorde habitats (welke steeds

meer ontstaan) en de mogelijkheid om zich voort te planten in gebieden waar te weinig voedsel voor twee individuen is, zijn waarschijnlijk de belangrijkste oorzaken van het feit, dat *C. inornatus* verdrongen wordt door *C. neomexicanus*, aldus Christiansen.

McKinney et al. (1973) beschrijven een nieuwe soort, *Cnemidophorus laredoensis* waarvan zij, op grond van morfologische en biochemische studies (electroforese studies van 15 eiwitten), veronderstellen dat zij ontstaan is als resultaat van een hybridisatie tussen *C. gularis* en *C. sexlineatus*.

Bickham et al. (1976) verrichtten cytogenetisch onderzoek aan deze parthenogenetische soort met het doel om ploëdie te bepalen en na te gaan in hoeverre karyotypische gegevens bruikbaar zouden zijn om de door McKinney et al. (1973) veronderstelde ontstaanswijze door hybridisatie te testen. Zij concluderen dat *C. laredoensis* een diploïde soort is met twee paar ongelijkvormige chromosomen die afgeleid kan zijn van een haploïde set chromosomen van *C. gularis* en *C. sexlineatus* en het verkregen cytogenetische resultaat in overeenstemming is met de morfologische en elektroforetische gegevens van McKinney et al. (1973).

Door Peccinini & Frota (1974) worden *Cnemidophorus* – populaties uit een geheel ander gebied beschreven. Op 15 plaatsen in de Amazonevallei werden respectievelijk 5 tweeslachtige en 10 parthenogentische populaties gevangen. In alle 10 parthenogenetische populaties waren een of meer paren chromosomen van ongelijke vorm aanwezig; in geen van de tweeslachtige populaties was dit het geval. In een studie, welke ten doel had om op gedetailleerde wijze de mate van histogenetische homogeniteit binnen een kloon te bepalen, voerde Cuellar (1976) 175 huidtransplantaties uit tussen 20 individuen van twee gescheiden populaties *C. uniparens*. Uit de resultaten (98,8% van de transplantaten werd permanent geaccepteerd) wordt geconcludeerd, dat alle individuen van beide populaties zeer waarschijnlijk genetisch identiek zijn, temeer daar transplantaten tussen individuen van de tweeslachtige *C. tigris* werden afgestoten. (De vier waargenomen afstotingsreacties (1,2%) werden waarschijnlijk veroorzaakt door technische transplantatiefouten in plaats van werkelijke histo – incompatibiliteit). Bovendien doen deze resultaten vermoeden, dat grote populaties of zelfs een gehele soort uit een kloon kan bestaan, welke van een individu is afgeleid.

In een ander artikel van Cuellar, samen met McKinney (Cuellar & McKinney, 1976) worden resultaten van huidtransplantaties aangewend om de éénslachtige ouder te bepalen van de natuurlijke hybride tussen deze soort en de tweeslachtige *C. inornatus*. De gegevens van elektroforese – studies en chromosoomonderzoek ondersteunen de transplantatieresultaten en de conclusie, dat *C. neomexicanus* een van de oudersoorten is en de andere zeer waarschijnlijk *C. inornatus* in plaats van *C. tigris*.

Schall (1978) onderzocht de voortplantingskarakteristieken bij vijf sympatrische *Cnemidophorus* – soorten: twee parthenogenetische en drie tweeslachtige. Hij vond geen verschillen tussen deze soorten; de parthenogenetische zijn waarschijnlijk te vergelijken met een van hun tweeslachtige oudersoorten. De voortplantingskarakteristieken van *Cnemidophorus* zijn afhankelijk van de lichaamsgrootte en ecologische positie van deze soort. De voortplantingskarakteristieken van de vrouwtjes werden bepaald aan de hand van het aantal gelegde eieren per nest, het lichaamsgewicht en het gewicht van de eieren. Op basis van deze gegevens bepaalde Schall de zogenaamde "voortplantingspoging" (reproductive effort), die gedefinieerd werd als het gewicht van een nest gelegde eieren, gedeeld door het gewicht van de moeder. Op deze faktor werden de statistische berekeningen uitgevoerd.

Congdon et al. (1978) verkregen echter hiermede in strijd zijnde resultaten van een studie van vier soorten: twee 2 – slachtige en twee parthenogenetische. Deze werden naar grootte ingedeeld: twee waren klein, *C. inornatus* (tweeslachtig) en *C. uniparens* (parthenogenetisch) en de andere twee soorten waren groter: *C. tigris* (tweeslachtig) en *C. sonora* (parthenogenetisch). Congdon et al. concludeerden, dat de parthenogenetische soorten nesten met meer eieren leggen en dat dit aantal sneller toeneemt naar gelang de lichaamsgrootte van de moeder.

Schall (1981) is van mening, dat deze afwijkende resultaten het gevolg zijn van fouten in zowel de keuze als de uitwerking van de statistische testen. Hij komt dan ook tot andere conclusies uit dezelfde gegevens nadat de (volgens Schall) "juiste" analyse wordt uitgevoerd. Volgens hem is er weliswaar enig verschil in de voortplantingskarakteristieken (aantal eieren per nest, gewicht van de eieren en de verhouding tussen het totaalgewicht van een nest eieren en het lichaamsgewicht van de moeder), maar is dit verschil geen gevolg van de voortplantingswijze van de vergeleken soorten.

Cole (1979) verrichtte cytogenetisch onderzoek aan 220 cellen van 36 hagedissen uit de twee triploïde parthenogenetische soorten *Cnemidophorus exsanguis* en *Cnemidophorus sonora* en de diploïde tweeslachtige *Cnemidophorus tigris*. *C. exsanguis* heeft een triploïd karyotype ( $3n = 69$ ), dat is opgebouwd uit drie gelijke haploïde componenten ( $n = 23$ ), die karakteristiek zijn voor de *sexlineatus* groep. Het karyotype van *C. exsanguis* is gelijk aan dat van *C. sonora*. Er komen echter ook modificaties voor in dit triploïde karyotype; op sommige plaatsen worden twee – of meervormige chromosoomsets gevonden, dat wil zeggen dat een bepaald chromosoom, dat driemaal aanwezig behoort te zijn in een triploïde configuratie, in twee of meer verschillende vormen wordt aangetroffen. Uit laboratoriumkweken kon Cole aantonen, dat deze chromosoom – afwijkingen steeds van moeder op dochter werden overgeërfd. Het is dus onwaarschijnlijk, dat deze erfelijkheid het resultaat is van een willekeurige sortering van de chromosomen tijdens de oögenese zoals die waarschijnlijk bij diploïde tweeslachtige *Cnemidophorus* – soorten

voorkomt. Integendeel, het blijkt, dat de chromosomale heterozygositeit een permanent karakter heeft. Cole concludeert dan ook, dat iedere triploïde moeder haar eigen gemodificeerde triploïde karyotype precies zo doorgeeft aan haar dochters, die zich parthenogenetisch uit een triploïd ei ontwikkelen. Deze conclusie is in overeenstemming met de hypothese, dat de oögenese in parthenogenetische *Cnemidophorus* –soorten een extra premeiotische endoduplicatie van de chromosomen omvat, "pseudobivalenten" vormt, die uit "zusterchromosomen" bestaan, waarna de oöcyten een normale meiose ondergaan. Tevens nam Cole de vorming van een levensvatbare tetraploïde hybride waar, die ontstaan was uit een eikel van een triploïd parthenogenetisch vrouwtje, dat bevrucht was door een haploïde zaadcel van een diploïde, tweeslachtige soort. De waarneming bevestigt de hypothese, dat sommige parthenogenetische soorten door hybridisatie zijn ontstaan. Tevens verklaart deze waarneming de ontstaanswijze van de ongewone polyplöïde reptielen, die soms in de natuur worden aangetroffen.

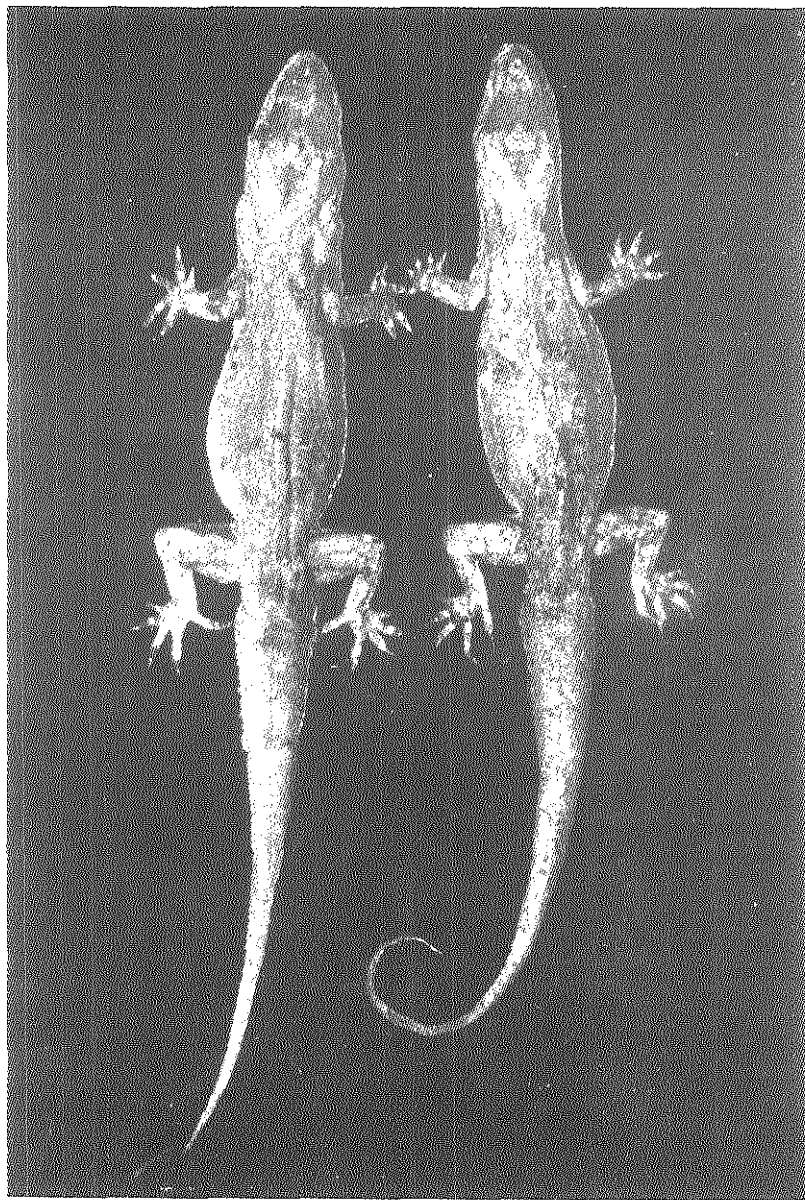
#### II – 4.2.4 Gekkonidae: Gekkós

Zoals reeds eerder vermeld, werd door Smith (1935) reeds in 1935 melding gemaakt van het feit, dat hij tussen meer dan 100 onderzochte gekko's ( *Hemidactylus garnotii* ) niet een mannetje kon ontdekken. Pas een kwart eeuw later wordt het vermoeden uitgesproken, dat de soort zich parthenogenetisch zou kunnen voortplanten. Deze suggestie werd gedaan door Mertens (1959), die constateerde, dat mannelijke *H. garnotii* uiterst zelden voorkomen: "Parfois, les mâles prédominent comme c'est le cas pour certain Crapauds ( *Bufo* ) et peut – être aussi pour le Sphenodon. Le contraire semble se produire chez quelques Crocodiles et chez certain Geckos comme l' *Hemidactylus garnotii* indo – pacifique, dont les mâles semblent être très rares. Ils font même entièrement défaut chez quelques races du Lézard des roches d'Arménie ( par exemple *Lacerta sacicola armeniaca* ). Alors que les formes voisines possèdent des mâles en nombre normal, on n'a jamais trouvé un mâle de cette sous – espece, ni en liberté, ni parmi les nombreux jeunes élevés en captivité depuis l'oeuf. A l'instar de nombreux invertébrés, ces Lézards paraissent se multiplier par parthénogénèse et il est, par conséquent, possible que ce mode de reproduction si spécial soit un jour signalé chez d'autres Lézards, chez des Geckos par exemple".

Hoewel er in de literatuur ook melding gemaakt werd van mannelijke *H. garnotii* (Boulenger, 1885; De Rooij, 1915; Taylor, 1921; Brongersma, 1934; Cagle, 1946; La Rivers, 1948), bleken deze waarnemingen later op foutieve geslachts – en/of soortbepaling te berusten (Kluge & Eckhardt, 1969).

Ook Taylor ( 1963 ) vond geen *Hemidactylus garnotii* mannetjes tijdens zijn studie en collectionering van de reptielenfauna op Thailand. Hij vindt het echter te





*Hemidactylus garnotii*, lengte 120 mm  
(Uit: Taylor, 1963).

gemakkelijk om "dus" parthenogenese te veronderstellen: "The absence of male specimens from collections can scarcely be explained save for the possibility of parthenogenesis which seems too improbable to be considered". Behalve bij *Hemidactylus garnotii* vond Taylor eveneens uitsluitend vrouwtjes van twee andere soorten : *Lepidodactylus lugubris* en *Lepidodactylus divergens*.

Kluge & Eckhardt (1969) onderzochten 218 *H. garnotii* exemplaren, welke verzameld waren in het gehele verspreidingsgebied. Bij alle dieren werden de gonaden geïdentificeerd als ovaria, terwijl het gemiddelde somatische chromosoom – aantal 70 bleek te zijn, hetgeen zeer waarschijnlijk berust op triploïdie; immers, bij 17 andere onderzochte soorten bleek dit aantal te variëren van 32 tot 46; een soort (dat waarschijnlijk ook triploïd is) 63. Op grond van deze waarnemingen concluderen zij als eersten, dat deze soort zich door middel van parthenogenese moet voortplanten.

Eckhardt & Whimster (1971) voerden huidtransplantaties uit tussen volwassen *Hemidactylus garnotii* vrouwtjes teneinde extra bewijzen te verkrijgen voor de door Kluge & Eckhardt (1969) veronderstelde eenslachtigheid. Bij twee dieren werden stukjes huid van de rug van het ene dier getransplanteerd naar de buik van het andere dier en omgekeerd. Er vond geen enkele afstotingsreactie plaats. Als controle op de (zeer onwaarschijnlijke) mogelijkheid, dat deze twee dieren toevallig een een – eïge tweeling konden vormen, werd van een van deze dieren een huidtransplantatie naar een derde dier verricht. Ook dit transplantaat werd volledig geaccepteerd. Geconcludeerd wordt dan ook, dat de veronderstelde éénslachtigheid zo goed als bewezen is, tenzij deze soort geen algemeen bij gewervelde dieren aanwezige immuniteitsmechanisme zou bezitten.

Met Cuellar beschrijft Kluge in 1972 een tweede parthenogenetische gekkosoort, *Lepidodactylus lugubris*. Reeds eerder had Taylor (1963) gewezen op het feit, dat hij tijdens het collectioneren van reptielen in Thailand uitsluitend vrouwelijke exemplaren van deze soort had waargenomen. De waarneming van Cuellar & Kluge werd gedaan tijdens een onderzoek naar de systematiek van *Lepidodactylus* op verschillende eilanden in de Grote en de Indische Oceaan. Bij 673 individuen werd het geslacht bepaald; slechts 4 vertoonden mannelijke kenmerken. Op grond van testismorfologie werd normale spermatogenese onwaarschijnlijk geacht. Ook bij andere parthenogenetische soorten zijn incidenteel mannetjes waargenomen (Maslin, 1962; Schultz & Kallman, 1968; Taylor et al., 1967; Taylor & Medica, 1966). Het betrof hier triploïde hybriden. Op grond van het fenotype en het feit, dat er geen verwante sympatrische tweeslachtige soorten waren waargenomen, wordt dit onwaarschijnlijk geacht voor deze vier *L. lugubris* mannetjes. Deze sterk afwijkende geslachtsverhouding en de afwezigheid van sperma in de oviducten (ook bij vrouwtjes, die in het kritieke stadium van de voortplantingscyclus zijn) en de positieve huidtransplantaties zijn voor Cuellar & Kluge voldoende redenen om *L. lugubris* als parthenogenetische soort te beschouwen. Gelet op het aantal

waargenomen somatische chromosomen (44) en de diploïde en triploïde aantallen, welke van andere gekko's bekend zijn, nemen zij aan, dat *L. lugubris* diploïd is. De bevindingen van Makino en Momma (1949) bij de gekko *Gehyra variegata ogasawarasimae* (er werden uitsluitend vrouwtjes gevonden, die allemaal 63 somatische chromosomen bleken te bezitten) deden bij Hall (1970) het vermoeden rijzen, dat het hier eveneens een triploïde parthenogenetische soort betrof, vooral wanneer men de bekende diploïde chromosoom – aantallen van andere gekko's in aanmerking neemt. De auteurs constateren, dat "The number of chromosomes here established for the female complex of this species is undoubtedly odd, and this is clearly due to the inclusion of a solitary unmated chromosome in the complex" en "the karyotype of this form which is highly different from that of any species of this family hitherto recorded". Ondanks deze waarnemingen, die beide duidelijk in de richting van heteroplöidie wijzen, komen Makino & Momma niet op de gedachte, dat het hier een triploïde (partenogenetische) soort zou kunnen zijn!

Mau (1978) verzamelde op 5 Augustus 1974 twee exemplaren van *Lepidodactylus lugubris* op een klein koraaleiland voor de noord – oost kust van Australië. Beide dieren waren vrouwtjes, hetgeen bleek uit het eieren leggen, dat later werd waargenomen. Zij werden in twee speciaal ingerichte terraria gehuisvest. Een van de dieren legde iedere 39 dagen twee eieren. Uit een daarvan kwam op 30 September 1976 (na 93 dagen ontwikkelingstijd) een levend jong. Het dier groeide in een speciaal terrarium op en werd in een ander terrarium geplaatst toen het volwassen was. Op 4 Juli 1977 legde dit dier haar eerste ei; op 14 Augustus twee eieren en daarna, op 22 September, nogmaals twee eieren. Op 21 October werd uit een van de eieren een levend embryo gehaald, waarmee het parthenogenetische voortplantingsmechanisme onweerlegbaar was bewezen. Recent werd door Werner (1980) homoseksueel gedrag waargenomen bij *Lepidodactylus lugubris*. Hoewel Werner ook twee andere mogelijke verklaringen voor dit gedrag geeft, acht hij het zeer waarschijnlijk, dat dit gedrag een uiting is van de sociale hiërarchie of van superioriteit binnen haar territorium.

## II – 4.2.5 Iguanidae: Leguanen

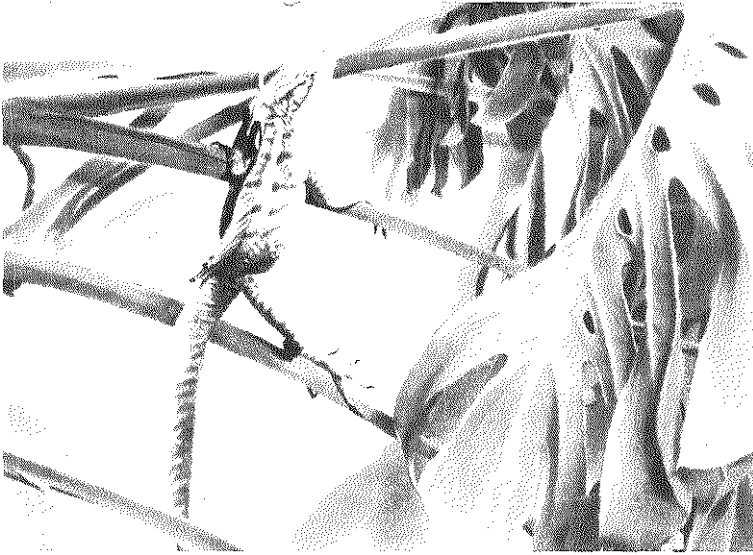
Het vermoeden, dat parthenogenesis ook bij leguanen voorkomt, is slechts een keer in de literatuur vermeld en berust op een zeer bijzondere samenloop van omstandigheden. Böhme beschrijft in 1975 een collectie van 18 leguanen (*Basiliscus basiliscus* Linnaeus), welke hij van de Heer Kraus, een amateur – terrariumhouder, had gekregen. Deze Heer Kraus had Böhme erop attent gemaakt, dat hij verscheidene jaren drie leguanenvrouwtjes in zijn terrarium had houden, die na jaren opeens en relatief kort na elkaar goed ontwikkelde legsels voortbrachten. Hoewel het ook toen reeds bekend was, dat bij verschillende reptielen, met name bij slangen (Groves, 1973), de vrouwtjes jarenlang sperma

kunnen opslaan, waarvan de bevruchtingsmogelijkheden behouden blijft, wordt ook aan de mogelijkheid van parthenogese gedacht. Deze laatste hypothese werd later waarschijnlijker geacht toen de dierenhandelaar, bij wie de Heer Kraus een mannelijke en twee vrouwelijke Basiliken had besteld, zich verontschuldigde toen hij drie vrouwtjes leverde met de mededeling, dat de totale Basiliken import ditmaal "waarschijnlijk toevallig" uitsluitend uit vrouwtjes bestond. De dierenvanger in Columbia moet dus toevallig in een uitsluitend uit vrouwtjes bestaande populatie zijn vangst hebben gedaan. Op grond van het bovenstaande, concludeert Böhme: "Damit scheint fast sicher, dass die drei sich selbst reproduzierenden Weibchen tatsächlich aus einer parthenogenetischen Freilandpopulation, irgendwo in Kolumbien, stammen".

## II – 4.2.6 Agamidae: Hagedissen van de oude wereld

Hall (1970) wees op de mogelijkheid van het bestaan van partheno – genese bij drie verschillende reptielenfamilies: GEKKONIDAE, CHAMAE – LEONTIDAE en AGAMIDAE (respectievelijk Gekko's, kameleons en hagedissen). Uit de laatstgenoemde familie betrof het de soort *Leiolepis*, waarvan vertegenwoordigers werden aangetroffen bij twee handelaren in Bangkok en Singapore. De vijf "Bangkok – exemplaren" bestonden uit twee vrouwtjes en drie mannetjes met gemiddeld 36 chromosomen. De 33 "Singapore – exemplaren" waren daarentegen allemaal vrouwtjes. Van deze groep werden 13 dieren cytogenetisch onderzocht: alle dieren bleken 54 chromosomen te hebben. Op grond van deze gegevens vermoedde Hall, dat het hier een triploïde parthenogenetische soort betrof.

Peters (1971) onderzocht de fylogenetische verwantschappen van het genus *Leiolepis* met behulp van vergelijkende morfologische studies. Hij onderscheidt vier tweeslachtige en een eenslachtige soort. Deze studies werden verricht aan onder andere een aantal exemplaren, die hij van Hall (1970) ter bestudering had ontvangen en bevestigden diens vermoeden ten aanzien van parthenogenese op grond van morfologische verschillen met de andere soorten uit het genus *Leiolepis*. Als curiositeit kan nog vermeld worden, dat verschillende onderzoekers (Hall, Sochurek en Peters) bij de handelaar in Singapore de plaats van herkomst probeerden te achterhalen. Deze, kennelijk beducht voor zijn handel, weigerde dat echter consequent! Slechts Dr. Ross van de Tufts University Medical School, die ook Agamen had gekocht van andere leveranciers in Singapore, kreeg een indicatie van de vindplaats: het grensgebied tussen Maleisië en Thailand! Indien dit juist is, leven deze dieren binnen het verspreidingsgebied van de *belliana* – groep, hetgeen – volgens Peters – te rijmen valt met de gevonden morfologische overeenkomsten. Na uitwisseling van de bevindingen van Hall (1970) komt Peters ten aanzien van de *Leiolepis* triploïda tot de volgende "diagnose": "Eine durch Triploidie ( $3n = 54$ )



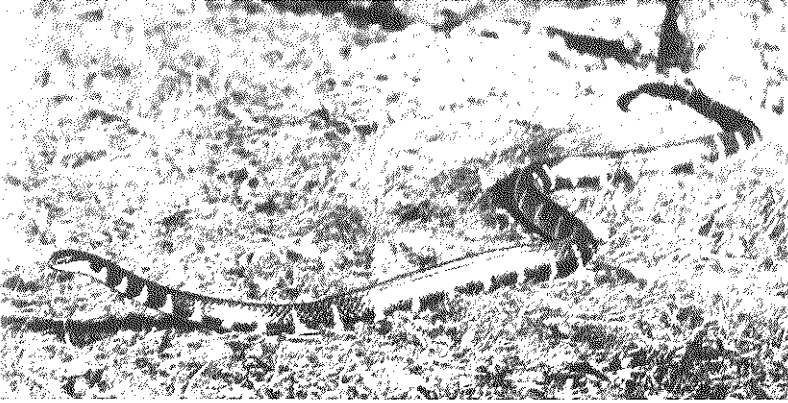
*Basiliscus basiliscus*

(Uit: Vogel, Z. (1964) "Reptiles and Amphibians, their care and behaviour". Urania-Verlag, Leipzig).



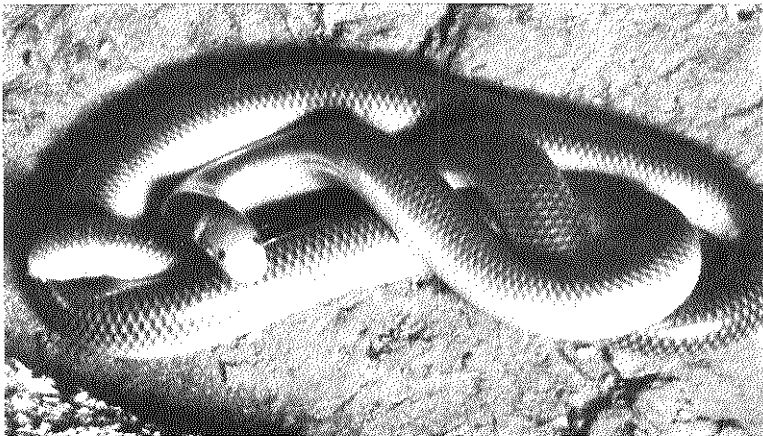
*Gehyra variegata*

(Uit: H. C. Logger, (1975) "Reptiles and Amphibians of Australia", Reed Pfy Ltd, Sydney).



*Boiga dendrophilia*

(Uit: Vogel, Z. (1964) "Reptiles and Amphibians, their care and behaviour". Urania-Verlag, Leipzig).



*Typhlops unguirostris*: een australische soort van de blinde slang (groeit tot circa 60 cm).

(Uit: A. Bellairs, (1969), "The life of Reptiles". Vol. I. Weidenfeld and Nicolson, London).

und ameiotische Parthenogenese von ihrer Ursprungsform ( *Leiolepis belliana* )  
isolierte Agamospecies von beschränkter Fertilität

#### II – 4.2.7 Chamaeleonidae: Kameleons

Naar aanleiding van een artikel van Schmidt (1919) is het wederom Hall (1970), die het vermoeden uitspreekt dat een daarin beschreven kameleonsoort zich op parthenogenetische wijze voortplant. In zijn artikel beschrijft Schmidt (1919) onder andere een collectie van 63 kameleons ( CHAMAELEONTIDAE : *Rhampholeon boulangeri* Steindachner. Deze collectie was afkomstig uit het Ituri bos in het voormalige Kongo en bevatte uitsluitend vrouwelijke exemplaren. Enige jaren eerder was een kleinere collectie van 9 dieren beschreven, waarin wel mannetjes voorkwamen (Sternfeld, 1912). Deze dieren waren bij het meer gevangen en verschilden aanzienlijk in lengte met de dieren uit de andere collectie. Zij waren 50 tot 61 mm lang, terwijl de Ituri – populatie een gemiddelde lengte van 70 mm had. Op grond van deze lengteverschillen, achtte Schmidt het zeer waarschijnlijk, dat een verdere studie van de Ituri – populatie zou leiden tot het onderscheiden van deze soort als, waarschijnlijk, een aparte ondersoort. Het feit, dat er geen mannetjes in de Ituri – collectie waren, werd door Schmidt wel opvallend genoemd, doch niet in verband gebracht met de mogelijkheid van parthenogenese. Hij constateert slechts: "The present collection contains sixtythree specimens, all – curiously – females"! Hoewel er later ook mannelijke exemplaren van deze soort gevonden werden in twee kleine populaties uit Kameroen, acht Hall (1970) het toch waarschijnlijk, dat de door Schmidt beschreven collectie zich langs parthenogenetische weg voortplante.

#### II – 4.3 Squamata: Suborde Serpentes (Slangen)

Evenals bij de kameleons is het aantal beschrijvingen van waarnemingen en/of vermoedens ten aanzien van parthenogenese bij slangen zeer beperkt. In 1974 stelt McDowell (1974) een catalogus en determineertabellen samen van slangen afkomstig uit Nieuw – Guinea en de Solomon Eilanden. In dit gebied komen twee genera uit de familie der TYPHLOPIDAE voor : *Typhlops* en *Typhlina* , welke met name op basis van mannelijke geslachtskenmerken onderscheiden en ingedeeld worden (Robb, 1966B). Een soort, aldus McDowell, kan hierdoor echter moeilijk ingedeeld worden "since it is an all – female, presumably parthenogenetic, species; although evidence is not conclusive, there is reason to believe "T." *braminus* is an all – female derivate of *Typhlina* ..... Because of the absence of males in " *Typhlops* *braminus*, it is impossible to say definitely whether this species is referable to *Typhlops* or to *Typhlina* , genera distinguishable on the basis of the male reproductive apparatus". McDowell onderzocht totaal 118 *T. braminus*



*Rhampholeon boulengeri*  
(Uit: Schmidt, 1919).



exemplaren, waarvan er vier te uitgedroogd waren om het geslacht nog betrouwbaar te kunnen bepalen. Alle overige 114 exemplaren waren van het vrouwelijk geslacht, waarbij de aanwezigheid van een (rechter) oviduct – waargenomen onder de preparateur – microscoop – als criterium werd gebruikt.

Parthenogenese als type – voortplanting zou veel van het succes verklaren, dat deze soort heeft in de uitbreiding van zijn verspreidingsgebieden en het bezetten van geïsoleerde eilanden (De Rooij, 1917 ; Mertens, 1930 ; De Haas, 1950 ). Samen met *Pelamis platurus* vormen zij de twee meest verspreide slangensoorten. Het is daarom extra verwonderlijk, dat er zo weinig onderzoek is verricht naar deze, qua voortplantingswijze, zo unieke soort.

Naar aanleiding van de publikatie van McDowell (1974) stelde Broadley (1974) in hetzelfde jaar een overzicht samen van alle gepubliceerde waarnemingen van *T. bramina* exemplaren in Afrika. Bradley vond totaal 8 publicaties. Daarin werden vindplaatsen vermeld in Somalië, Kenya en Tanzania, Mozambique en Zuid – Afrika. In verband met de sterke verspreiding van deze soort wijst Loveridge (1945) op de geringe grootte van deze slangen waardoor het zeer goed mogelijk is, dat de mens in grote mate verantwoordelijk is voor deze verspreiding, onder andere in de grond van getransporteerde potplanten, waardoor deze dieren ook wel "Flowerpot Snakes" worden genoemd. De meest introducties van deze dieren aan de Oost – Afrikaanse kustplaatsen zijn echter waarschijnlijk veroorzaakt door het vele zand, dat in Arabische kustvaartuigen als ballast werd gebruikt en na aankomst in een Afrikaanse haven overboord werd gedumpt. In 1968 werd deze soort voor het eerst door Storr (1968) ook in Australië waargenomen.

Zeer recent werd een collectie van 32 exemplaren beschreven door Nussbaum (1980). Deze dieren waren afkomstig van verschillende eilanden van de Seychellen archipel. Nussbaum refereert naar de verschillende benamingen van "de blinde slang" en geeft de voorkeur aan de naam *Ramphotyphlops braminus* in navolging van Stimson et al. (1977). Ook Nussbaum is van mening, dat het een parthenogenetische soort is, niet alleen vanwege het feit, dat ook hij uitsluitend vrouwtjes waarnam, maar ook op grond van de opmerkelijke overeenkomst in het patroon van huidschubben en kleurpatronen. Ook de zeer grote verspreiding van deze soort, dikwijls op zeer geïsoleerde plaatsen, pleit voor het bestaan van parthenogenese.

Interessant in verband met het mogelijk optreden van parthenogenese bij reptielen is het verschijnsel van "verlate bevruchting". Hierbij gaat men uit van een langdurige opslag van zaadcellen in vrouwelijke dieren na een copulatie. Behalve deze mogelijkheid tot opslag moet eveneens een zeer langdurige vitaliteit van de zaadcellen worden verondersteld omdat bekend is, dat vrouwtjes soms na een langdurig isolement nog levende jongen voortbrengen, zelfs meerdere nesten.

Groves (1973) geeft een overzicht van de literatuur over verlate bevruchting bij reptielen. Tevens beschrijft hij eigen waarnemingen aan een slang, *Boiga dendrophilia*, die samen met een tweede exemplaar in volkomen isolement in een dierenkooi in Baltimore leefde. Na de dood van het andere dier werd sectie verricht en vastgesteld, dat het eveneens een vrouwtje betrof. De slang legde in de derde week na isolatie in de kooi vier eieren, waarvan er een per ongeluk na 42 dagen werd opengebroken; de drie andere waren reeds bedorven. Het opengemaakte ei bevatte een levend embryo van circa 26 mm. (de moeder was 1,72 m. lang). Ruim een jaar later legde dit dier nogmaals vijf eieren. Na een incubatie – periode van 108 dagen kwamen twee eieren uit. Een ander ei was reeds in het begin van de incubatieperiode verloren gegaan en de resterende twee werden na 113 dagen opengebroken. Ook deze twee eieren bevatten levende jongen. De vier jonge dieren waren ongeveer 250 mm. lang en bezaten hetzelfde kleurenpatroon als de moeder. Omdat er geen onderzoek verricht werd bij de moeder in hoeverre er inderdaad nog levende zaadcellen aanwezig waren kan men geen conclusie trekken ten aanzien van de mogelijkheid of hier sprake was van een parthenogenetische wijze van voortplanten. Onlangs werd door Magnusson (1979) melding gemaakt van een volledig gedifferentieerd embryo in het ei van een slang, die voor haar dood 7,5 jaar in volkomen isolement had geleefd. Na de dood, werd het dier onderzocht en werden in de linker eileider drie, en in de rechter eileider zeven, eieren gevonden. Negen eieren bevatten slechts dooiermateriaal, terwijl het tiende ei een 375 mm lang embryo bevatte, dat geen afwijkingen vertoonde. Doordat de organen van het embryo slecht gepreserveerd waren (het was waarschijnlijk enige dagen voor de moeder gestorven), kon het geslacht niet met zekerheid worden vastgesteld. Het ontbreken van een typisch mannelijk embryonaal kenmerk duidt erop, dat het hoogstwaarschijnlijk een vrouwelijk embryo was. Hoewel, zoals reeds eerder vermeld, lange perioden van opslag van zaadcellen bij slangen zijn beschreven (de langste periode tot dan toe bekend was vijf jaar bij een *Leptodeira onnulata polysticta*; Haines, 1940), vraagt Magnusson zich af of het hier geen geval van parthenogenese betrof en pleit hij voor verder onderzoek naar de vraag of er bij deze dieren, ACROCHORDIDAE, sprake is van een mogelijkheid tot extreem lange opslag van zaadcellen in de vrouwelijke exemplaren of dat er mogelijk parthenogenese bij deze dieren voorkomt.

#### II-4.4 Schildpadden en Krokodillen

Voor zover bekend zijn er geen publikaties over het (mogelijk) voorkomen van natuurlijke niet-zygogenetische wijzen van voortplanten bij schildpadden en krokodillen.

## II – 4.5 Samenvatting en conclusies

Hoofdstuk II – 4 geeft een overzicht van de literatuur inzake de natuurlijke niet – zygotenetische wijzen van voortplanten bij de reptielen. Bij deze klasse der gewervelde dieren is de literatuur over dit onderwerp het talrijkst en meest omvattend. Behalve bij de schildpadden en krokodillen zijn er bij alle andere reptielen – orden diersoorten beschreven waarvan men soms vermoedt en soms heeft aangetoond dat zij zich parthenogenetisch voortplanten.

De vermoedens berusten op waarnemingen bij in de natuur gevangen collecties dieren die uitsluitend uit vrouwtjes bleken te bestaan. Hoewel het dikwijls aanzienlijke aantallen betreft is er uiteraard op deze wijze geen bewijs geleverd dat er sprake is van parthenogenese. Dit bewijs werd voor het eerst in 1958 geleverd aan de hand van een studie over de voortplanting bij een hagedis, *Lacerta saxicola*. Bij deze soort werd waargenomen dat vrouwtjes die ruim voor het bereiken van het volwassen stadium van mannetjes werden gescheiden en daarvan strikt geïsoleerd verder leefden, toch na het overwinteren eieren legden. Uit deze eieren kwamen uitsluitend vrouwtjes die in ieder opzicht op de moeder leken. Soortgelijke experimenten werden later ook door andere onderzoekers uitgevoerd. Hierbij werden dezelfde resultaten verkregen.

In tegenstelling tot de beschreven zygotenogenetische vis – en amfibie – soorten en tot de enkele vermoede parthenogenetische vissoorten, is hier dus sprake van een bewezen parthenogenetische wijze van voortplanten.

Behalve bij de bovengenoemde *Lacerta* – soort zijn er ook bij andere hagedissen – soorten uitsluitend vrouwtjes aangetroffen in de natuur. Met name zijn veel waarnemingen gedaan aan verschillende *Cnemidophorus* – soorten, niet alleen ten aanzien van de wijzen van voortplanten, maar ook, teneinde de ontstaanswijze van de soort op te kunnen helderen, ten aanzien van ecologische, ethologische en fysiologische verschillen zoals geografische verspreiding, habitat voorkeur en eetgewoonten alsmede biochemische en cytogenetische verschillen.

Het cytogenetisch onderzoek van de oögenese dateert pas uit 1971. Daarna is er echter veel onderzoek in deze richting gedaan. Hieruit bleek dat er zowel diploïde als triploïde soorten zijn. Voor het constant houden van het aantal chromosomen wordt een pre – meiotische endo – replicatie verondersteld die echter niet is bewezen. Dit zou mogelijk zijn met behulp van DNA metingen en ander cytogenetisch onderzoek aan oögonia en eicellen in verschillende ontwikkelingsstadia.

De verschillende beschreven succesvolle huidtransplantatie – studies hebben aanvullend bewijsmateriaal geleverd voor het bestaan van parthenogenese tenzij deze dieren over een sterk afwijkend immuniteitsmechanisme zouden beschikken.

Behalve bij het reeds genoemde bewijs ten aanzien van het voorkomen van parthenogenese bij *Lacerta saxicola* is dit in 1978 ook bij een gekko – soort geleverd. Het betrof hier een in 1974 in de natuur gevangen *Lepidodactylus lugubis* vrouwtje dat in strikte afzondering in een terrarium werd geplaatst. In dit terrarium legde het dier iedere 39 dagen 2 eieren. Uit een van deze eieren kwam in 1976 een levend jong dat zelf ook eieren begon te leggen. Uit een van de eieren van dat dier kwam in 1977 wederom een levend jong dat eveneens in volwassen stadium eieren begon te leggen.

Hoewel men ook bij slangen het voorkomen van parthenogenese vermoedt is er bij deze diersoorten geen overtuigend bewijs geleverd. Een bijkomend probleem om dit aan te tonen is het feit dat bij slangen het verschijnsel van "verlate bevruchting" optreedt. Hierbij worden de zaadcellen in spermakamers bij de vrouwtjes opgeslagen waarna het bevruchtend vermogen jarenlang behouden kan blijven. Op deze wijze is het mogelijk dat vrouwtjes na een langdurig isolement tocht nog zygonetische jongen voortbrengen. Toch lijkt een waarneming uit 1979 waarin een slang, na een isolement van 7,5 jaar, nog een ei met een nagenoeg volgroeid embryo bevat, te duiden op parthenogenese.

Geconcludeerd kan worden dat er bij verschillende reptielen onweerlegbaar is aangetoond dat zij zich op parthenogenetische wijze voortplanten en fertiele nakomelingen krijgen.

Uit cytogenetisch en biochemisch onderzoek zijn veel aanwijzingen naar voren gekomen dat, evenals bij de reeds eerder beschreven vissen – en amfibieën – soorten, de parthenogenetische soorten ontstaan zijn door hybridisatie.

In tegenstelling tot de niet – zygonetische vissen en amfibieën is er bij deze reptielen echter sprake van parthenogenese en niet van zygotparthenogenese.

Om het aantal chromosomen bij de parthenogenetische soorten constant te houden wordt een pre – meiotische endo – duplicatie verondersteld omdat men wel twee meiotische delingen en de daarbij behorende poollichaampjes heeft waargenomen. Het juiste moment en mechanisme van deze endo – duplicatie is echter nog niet bepaald.

## HOOFDSTUK II – 5

### NATUURLIJKE PARTHENOGENESE BIJ VOGELS

#### II – 5.1 Inleiding

Prévost en Dumas (1827, 1828) onderzochten de ontwikkeling van kippe – embryo's, waarbij zij met name de eerste veranderingen bestudeerden, die in het ei optreden als gevolg van de bevruchting. Tevens werden onbevuchte eieren bestudeerd en werd een ontwikkeling waargenomen en beschreven, die veel overeenkomst vertoonde met de normale ontwikkeling van een bevrucht kippe – ei. In feite betreft het hier de eerste beschrijving van een parthenogenetische ontwikkeling in een vogelei hoewel de auteurs dit verband zelf niet leggen.

Soortgelijke waarnemingen werden later eveneens door Coste (1849) en His (1868) gedaan. Oellacher (1872) onderzocht eveneens het mogelijke optreden van embryonale ontwikkelingen bij onbevuchte kippe – eieren, waarbij hij zich met name afvroeg wat het karakter was van de door Prévost en Dumas – en ook door hemzelf – waargenomen veranderingen: "Macht der Keim des Hühnereies, nachdem dasselbe aus dem organischen Zusammenhang mit dem Mutterthiere gerissen ist, d.h., nachdem es den Follikel gesprengt hat und aus demselben ausgetreten ist, nur mehr Veränderungen destruktiver Art durch; beginnt es sofort oder doch nach irgend welcher Zeit direkt der Desorganisation zu verfallen oder hat es die Fähigkeit weitere nachweisbaren, organischen Veränderungen durchzumachen?" In tegenstelling tot Prévost en Dumas komt Oellacher wel tot een conclusie ten aanzien van zijn waarnemingen en schrijft: "Ich fasse daher die beschriebene Vorgänge unter dem Namen der "Parthenogenese" zusammen".

Medestanders van Oellacher waren Motta Maia (1877), Kölliker (1879) en Duval (1884), waarbij het werk van laatstgenoemde door een onzorgvuldige opzet aan veel kritiek onderhevig is. Nog vele decennia zal het echter een twistpunt blijven of er inderdaad sprake is van parthenogenese; de voor – en tegenstanders wisselen elkaar regelmatig af. Tot de tegenstanders behoren Lau (1894), Barfurth (1895) en Lillie (1919): "The so-called parthenogenetic cleavage of such eggs is merely a phenomenon of fragmentation of the cytoplasm. There is no true cell division". Ook twee toonaangevende embryologen uit die tijd, R. Bonnet en R. Hertwig, waren beide van mening, dat er geen sprake was van parthenogenese.

Bonnet (1900) schreef, dat: "Les disques germinatifs des oeufs pondus par les poules vierges sont morts et que ni l'incubation artificielle, ni l'incubation naturelle, ni les mutilations ne peuvent provoquer leur développement".

Hertwig (1906) was van mening, dat alle waarnemingen van parthenogenetische celdelingen in werkelijkheid aan eieren gedaan waren, die op "een meer of minder abnormale manier" bevrucht waren.

Hays en Nicolaides (1934) vonden geen op cellen gelijkende configuraties in de kiemschijven van onbevruchte kippe-eieren en concludeerden eveneens, dat er geen sprake was van parthenogenese omdat zij onder andere geen kernen konden waarnemen. Lécaillon onderzocht het probleem zeer uitvoerig en publiceerde zijn waarnemingen in een serie artikelen in de jaren 1908 – 1910 (Lécaillon, 1908 – A en B; 1909 – A,B,C,D,E en F; 1910 – A,B,C,D en E). Deze artikelen worden door hem samengevat, waarbij hij eveneens een chronologisch overzicht geeft van het werk van andere onderzoekers over onbevruchte vogeleieren (Prévost et Dumas, 1827; Coste, 1949; His, 1868; Oellacher, 1872; Motta Maia, 1877; Kölliker, 1882; Duval, 1884; Lau, 1894; Barfurth, 1896; Bonnet, 1900, 1907; Hertwig, 1906).

Op gedetailleerde wijze beschrijft Lécaillon (1910) de vroege ontwikkeling van het onbevruchte kippe-ei en toont duidelijk aan, dat er sprake is van mitotische delingen: "The unfertilized hen's ovum undergoes a form of parthenogenetic cleavage".

Bartelmez en Riddle (1924) zijn eveneens van mening, dat zij parthenogenese hebben aangetoond. Op grond van vergelijkende microscopische studies en de mate van water-absorptie door het eigeel van bevruchte en onbevruchte duive-eieren concluderen zij, dat: "The existence of parthenogenesis in the pigeon is also demonstrated for the first time. This constitutes the second known case of parthenogenesis in birds".

In 1941 beschreef Olsen (1941) het optreden van fragmentatie in kippe-eieren, waarbij hij vermeldde, dat dit beschouwd moest worden als een abortieve vorm van parthenogenese, hoewel hij constateerde, dat de fragmentatie zeer sterk op normale celdelingen leek en dat "it produces small pieces that – in surface view – closely resemble true cell formation."

Later zal Olsen een van de grote pioniers worden in het onderzoek naar het voorkomen van parthenogenese bij kalkoene- en kippe-eieren.

## **II-5.2 Kalkoenen en kippen**

Met behulp van kleuringstechnieken worden enige jaren later door Kosin (1945) kernen aangetoond in de kiemschijven van onbevruchte kippe-eieren. Intakte kernen werden door hem in 25% van de microscopische preparaten van de onderzochte kiemschijven gevonden. In ruim de helft van deze kiemschijven werden

eveneens gemiddeld twee mitose figuren aangetroffen. Kosin concludeert, dat er sprake is van "abortive parthenogenesis in the unfertilized eggs of the domestic fowl. The process is "abortive" in contrast to the "functional" parthenogenesis of many lower forms..... The process is extremely brief, terminating soon after oviposition. It cannot be revived by incubation."

Als begin van een lange reeks artikelen, publiceren Olsen en Marsen in 1953 hun eerste verhandeling over parthenogenese bij kalkoene – eieren. Het was reeds lang bekend, dat zaadcellen van kalkoenen gedurende zeer lange tijd hun bevruchtungsvermogen in het lichaam van een hen behouden. Zelfs meer dan 50 dagen nadat hennen gescheiden waren van hanen werden nog bevruchte eieren gelegd (11 – 13%). In een enkel geval werd dit zelfs 70 dagen na een eenmalige inseminatie waargenomen. In 17% van de kalkoene – eieren, die 54 – 225 dagen na separatie van hanen en hennen gelegd waren, vonden Olsen en Marsden (1953) een vertraagde ontwikkeling. In een ei, dat 11 dagen in een broedstoof was geïncubeerd, vonden zij een embryo met een goed ontwikkeld vasculair systeem, dat overeenkwam met een normaal ontwikkeld embryo van 7 dagen. Dit ei was 195 dagen na de scheiding van hanen en hennen gelegd. Olsen en Marsden achtten het onwaarschijnlijk, dat de zaadcellen na een dermate lange periode nog steeds bevruchtungsvermogen zouden bezitten en kwamen dan ook tot de volgende conclusie: "It must be assumed that the egg itself, in the absence of sperm, was activated by some other stimulus and induced some type of development. If this were true, it might be a case of natural, but delayed, parthenogenesis in a higher order of animal."

Een jaar later isoleerden Olsen en Marsden (1954) 7 vier weken oude, nog niet geslachtsrijpe, kalkoenhennen en zorgden ervoor, dat ieder direct contact met hanen verder onmogelijk was; 16 andere hennen werden eveneens na 12 weken geïsoleerd. In 14,1% van de 1463 onderzochte eieren werd een vertraagde, abnormale embryonale ontwikkeling waargenomen na incubatie in een broedstoof (temperatuur: 37,5 graden Celsius; relatieve vochtigheid: 57%). Deze resultaten gaven een grote individuele spreiding te zien, namelijk 0 – 49%. Bovendien bleek, dat er ongeveer tweemaal zoveel embryonale ontwikkeling optrad bij eieren van hennen, die op vrij korte afstand van hanen gehouden werden dan bij eieren van hennen in hokken op circa 300 meter afstand van andere kalkoenen. Het verbale – en mogelijk ook visuele – contact tussen hennen en hanen lijkt derhalve van invloed te zijn op het optreden van parthenogenese.

Ook werden eieren op eenzelfde manier verzameld en geïncubeerd door Olsen en Marsden (1954 – B), doch in dit geval echter pas na negen dagen onderzocht. Indien zij tekenen van ontwikkeling vertoonden werden zij verder geïncubeerd. Van de 2.537 onderzochte eieren vertoonden 568 exemplaren (22,4%) parthenogenetische ontwikkeling. In acht exemplaren van laatstgenoemde hoeveelheid werden ontwikkelingen waargenomen, die overeenkwamen met de ontwikkelingsstadia van

een normaal 9 – 27 dagen oud embryo (de embryonale ontwikkeling duurt in totaal 28 dagen).

Cytologische studie toonde aan, dat alle dieren diploïde waren, terwijl in ieder van de vier gevallen, waarin het geslacht onderzocht werd, de vogel een mannelijke parthenogenont bleek te zijn (bij vogels is het mannetje homozygoot ten aanzien van de geslachtschromosomen). Door Olsen en Marsden (1954 – C) werd eveneens gewezen op de grote individuele verschillen, die kalkoenhennen van eenzelfde variëteit vertonen ten aanzien van het optreden van parthenogenetische ontwikkelingen: bij 60% van de 7 – 9 dagen geïncubeerde eieren van sommige hennen treedt celproliferatie op; bij de eieren van andere hennen is dit percentage na dezelfde incubatieperiode echter 0! Ook onderling vertonen de variëteiten aanzienlijke verschillen. Bij kippen van de Dark Cornish variëteit wordt bij 13,5% parthenogenese gevonden; bij de Silver Cornish slechts 1,5% en bij de New Hampshires en Rhode Island Reds in het geheel niet. Voorts toonden Olsen en Marsden (1954 – D) verband aan tussen het tijdstip, waarop de embryonale ontwikkeling in ("Beltsville Small White") kalkoene – eieren zichtbaar was en het percentage eieren, dat vervolgens ook uitkwam. Waarneming van embryonale ontwikkeling na incubatie gedurende 24, 32, 48 en 72 uur gaf het uitkomen van de eieren te zien bij resp. 79, 33, 28 and 8% van deze groepen. Opvallend was echter, dat er in 18% van de eieren, die na 72 uur incubatie nog geen tekenen van embryonale ontwikkeling vertoonden, zich – na verdere incubatie – toch nog embryonaal weefsel ontwikkelde, echter zonder embryo's. Verondersteld wordt, dat de laatste groep de onbevuchte eieren zijn, die zich (later) parthenogenetisch gaan ontwikkelen.

Kosin (1958) verrichtte bij een andere kalkoensoort ("Broad – breasted Bronze") soortgelijk onderzoek en vond onder andere dat kalkoene – eieren niet meer uitkwamen indien er er na 84 uur incubatie nog geen embryonale ontwikkeling kon worden waargenomen. Tevens stelde hij vast, dat een langere bewaartijd voor de incubatie in een broedstoof een groter percentage verlate embryonale ontwikkeling tot gevolg had. De mogelijkheid wordt geopperd, dat dit een gevolg is van het optreden van parthenogenese bij de oudere eieren.

Ook door Kosin en Nagra (1956) werd een grote spreiding gevonden in het percentage parthenogenetische ontwikkelingen bij kalkoene – eieren: na een incubatie van 10 uur: variërend van 0 – 80%; gemiddeld 58,4%. Dit percentage was aanzienlijk minder bij de ruim 3.000 eieren, welke na 7 dagen incubatie onderzocht werden: gemiddeld slechts 2,4%. Op grond van deze sterke daling spreken Kosin en Nagra dan ook van abortieve parthenogenese. Behalve de reeds door Olsen en Marsden (1954 – C) gerapporteerde verschillen in parthenogenetische ontwikkelingen tussen verschillende variëteiten vonden Kosin en Nagra eveneens een verschil in het percentage parthenogenetische ontwikkeling bij eieren afkomstig



van twee verschillende lokaties! Hieruit konkluderen zij, dat ook het milieu waarschijnlijk invloed heeft op het percentage abortieve parthenogenese.

Een ander vergelijkend onderzoek werd verricht door Poole en Olsen (1958). Zij vergeleken de percentages parthenogenetische ontwikkelingen bij eieren van drie rassen van de Dark Cornish chickens en vonden parthenogenetische ontwikkeling bij respectievelijk 63,6, 33,3 en 7,3% van de onderzochte eieren nadat deze 9 – 10 dagen een broedstof waren geïncubeerd.

Resultaten van een microscopisch onderzoek van parthenogenetisch embryonaal weefsel door Yao en Olsen (1955) tonen aan, dat in 95% van de parthenogenetische ontwikkelingen uitsluitend extra – embryonale membranen worden gevormd; bij 5% trad verdere ontwikkeling op: variërend van de aanwezigheid van bloed en bloedvaten tot goed ontwikkelde embryo's. Er werden veel delende cellen waargenomen: in vier niet al te duidelijke metafasen werden 69, 77, 82 en 82 chromosomen geteld. Op grond van bekende diploïde chromosoom – aantallen bij andere kalkoenen kan geconcludeerd worden, dat het hier eveneens diploïd weefsel betreft. Ook door Kosin (1948) werd door middel van cytologisch onderzoek diploïdie vastgesteld.

Een andere belangrijke faktor werd in 1955 door Olsen (1956) waargenomen. Hij constateerde, dat er mogelijk (ook?) een virus betrokken was bij het initiëren van parthenogenetische ontwikkelingen bij Dark Cornish kippen – eieren. Het was hem namelijk opgevallen, dat dezelfde dieren voor en na een vaccinatie met duivepokken – virus en andere dieren met kippepokken – virus een sterke stijging vertoonden in het percentage parthenogenese. Afhankelijk van de vaccinatiedatum werd het percentage met een faktor 3 – 9 keer vergroot!

Andere experimenten met kalkoenen vertonen, zij het in aanzienlijk mindere mate, eenzelfde beeld. Olsen concludeert, dat er aan twee voorwaarden moet worden voldaan voor het optreden van niet – abortieve parthenogenese: ten eerste moet men een hiervoor gevoelige variëteit uitkiezen en ten tweede moet er een "aktivator" in het bloed zijn. Het is Olsen nog niet duidelijk of dit alleen het kippepokken – virus is of dat er (ook nog) andere reagens, die zich eveneens in het vaccin bevinden, hiervoor verantwoordelijk zijn.

Een soortgelijk experiment, doch anders van opzet, werd in 1962 door Olsen en Poole (1962) uitgevoerd. Nu werd niet volstaan met een gemiddelde frequentie over de testperiode voor en na de vaccinatie (waardoor seizoensinvloeden niet uit te sluiten zijn), doch werden de eieren van twee groepen dieren (een controle – en een met kippepokken – virus gevaccineerde groep), welke op dezelfde dag gelegd waren, met elkaar vergeleken. Bovendien was van beide groepen de frequentie van het optreden van parthenogenese voor de vaccinatie bepaald. De controlegroep vertoonde voor en na de vaccinatiedatum van de experimentele groep

respectievelijk 13,6% en 17,1% parthenogenese. De gevaccineerde dieren respectievelijk 17,8% en 27,9%. De toename van deze frequentie was reeds 6 dagen na de vaccinatie bereikt en het verschil met de frequentie van parthenogenese van de controledieren bleef gedurende de gehele testperiode van drie maanden gehandhaafd. Dit betekent waarschijnlijk, dat de initiator – zeer waarschijnlijk dus het virus – zowel tot rijpe als zeer vele onrijpe follikels is doorgedrongen, aldus Olsen. Uit het feit, dat er zelden gedeelde onrijpe ovariële eieren gevonden worden concludeert Olsen, dat de "initiator", hoewel reeds aanwezig, latent blijft tot het moment van ovulatie. Deze interpretaties zijn echter nogal speculatief. Men kan immers ook – misschien wel met meer reden – veronderstellen, dat de ovariële eicellen in de follikels beschermd zijn tegen de actie van het initiërende agens. Pas na de ovulatie kan dit agens zijn werking uitoefenen, hetzij doordat het follikelmilieu de werking van de initiator belemmert, hetzij dat de initiator niet in de follikel doordringt, maar wel in de eileider aanwezig is.

Ook na subcutane inoculatie van kalkoenen met Rous sarcoma virus was reeds een verhoogd percentage parthenogenetische ontwikkeling gevonden (Olsen, 1961). Een controlegroep, bestaande uit zusters van dieren uit de experimentele groep, vertoonde in 15,9% parthenogenese, terwijl in de geïnoculeerde groep gedurende dezelfde testperiode van drie maanden gemiddeld 25,4% parthenogenetische ontwikkeling optrad. Wel werd dit verhoogde percentage aanmerkelijk later bereikt dan in het geval van vaccinatie met kippepokken – virus (respectievelijk na 27 en na 6 dagen).

Subcutane injecties bij maagdelijke kalkoenhennen met respectievelijk gedood "Newcastle disease", kippepokken – en Rous sarcoma virus hadden geen verhoogd percentage parthenogenetische ontwikkeling tot gevolg (Olsen, 1962 – A). De mogelijke rol van specifieke virale anti – lichamen als initiators kan dus worden uitgesloten. Op grond van de verkregen resultaten konkludeert Olsen, dat de in de vaccins aanwezige levende viruspartikeltjes de stimulerende factor voor parthenogenese zijn. Door Poole en Olsen (1957) werd met behulp van histologisch onderzoek het geslacht bepaald van 67 parthenogenetische embryo's, die in leeftijd varieerden van 16 dagen incubatie tot het moment van uitkomen (na 28 dagen). De geslachtsdiagnose was gebaseerd op de macroscopische waarneming van twee duidelijk mannelijke karakteristieken: de lange cilindervormige embryonale testis en de bij hanen altijd duidelijk aanwezige rechter gonade, die – hoewel iets kleiner dan de linker – zeer duidelijk te onderscheiden is van de gedegenerende rechter gonade van hennen. Alle embryo's werden als mannelijk geklassificeerd. De histologische resultaten (aanwezigheid van spermatogonia, Sertoli cellen en interstitiële cellen in de goed ontwikkelde seminifere tubuli) bevestigden volledig de geslachtsbepaling zoals die was gedaan op grond van bovengenoemde macroscopische criteria.

Poole en Olsen geven verschillende, theoretisch mogelijke, verklaringen voor het

uitsluitend voorkomen van mannelijke parthenogenetische embryo's. Bij kalkoenen is de hen heterogameet; zij produceert twee typen eieren: het ene met een enkel geslachtschromosoom, het andere zonder dit geslachtschromosoom. Uitgaande van het feit, dat de parthenogenonten diploïd zijn (Yao en Olsen, 1955) en de chromosoomverdubbeling optreedt in de haploïde eicel, ontstaan er twee typen diploïde eicellen, namelijk het ene met twee en het andere zonder geslachtschromosomen. Wanneer we nu aannemen, dat het eerste type lethaal is, zoals bekend is bij bijvoorbeeld *Drosophila* (Stalker, 1954), dan blijft alleen het 00-type over, derhalve het mannelijke type. Een andere mogelijkheid is een onvolledige oögenese in die zin, dat het tweede poollichaampje niet wordt afgesnoerd. Dit leidt in wezen tot hetzelfde bovengenoemde resultaat.

Healy en Olsen (1958) trachtten antwoord te vinden op de vraag waar en wanneer de parthenogenetische ontwikkeling begint. Zij onderzochten daartoe 13 onbevuchte eieren, welke 6 – 8 uur na ovulatie uit het oviduct waren verwijderd, en 39 recent gelegde – eveneens onbevuchte – eieren. Uit de eerste onderzochte eieren bleek, dat de eerste deling nagenoeg op hetzelfde tijdstip plaatsvindt als bij normaal bevruchte eieren: 5 tot 6 uur na ovulatie. Uit waarnemingen aan de tweede groep eieren (de recent gelegde) bleek op basis van cellellingen, dat de delingssnelheid van parthenogenetisch ontwikkelde eieren geringer is dan bij even oude, normaal bevruchte, eieren. Bovendien bleek uit het microscopisch onderzoek, dat de parthenogenetische cellen een gebrek aan organisatie en tekenen van geringe levensvatbaarheid vertoonden. De delingen waren vaak tot een klein gebied van de kiemschijf beperkt en hadden de neiging om meer lagen te vormen. In normaal bevruchte eieren zijn de delingen niet beperkt tot een klein gebied en spreiden de cellen zich in een enkele laag. De mening, dat hier sprake was van geringere vitaliteit, was gebaseerd op het waarnemen van vacuolen in het protoplasma.

In hetzelfde jaar wordt tijdens een ander congres, het elfde "World's Poultry Congress", in Mexico City, eveneens door Kosin en Sato voor het eerst melding gemaakt van een parthenogenetisch ontwikkeld ei, dat het kuikenstadium bereikte, met andere woorden tot het moment van uitkomen bleef leven (Kosin, Sato en Nagra, 1958). Later wordt eveneens melding gemaakt van vier BSW parthenogenonten, alle vier hanen. Op een leeftijd van 20 weken werden bij drie van deze hanen levende zaadcellen waargenomen (Poole, 1959).

Ook Olsen (1960) beschrijft de geboorte van een kalkoenuiken in het voorjaar van 1958. Dit kuiken werd uit een ei geboren uit een serie van meer dan 8.000 (!) onbevuchte en geïncubeerde eieren afkomstig van 214 BSW kalkoenen. Bij 722 (9.0%) van deze 8.000 eieren werden verschillende embryonale stadia waargenomen. Hieronder bevonden zich 20 embryo's, die 29 dagen incubatie overleefden en uit het ei geholpen werden. Drie kuikens groeiden op tot volwassen hanen, waarvan er een bruikbare hoeveelheid sperma produceerde voor inseminatieproeven. Met dit sperma werd in Januari 1959 een aantal BSW hennen geïnsemineerd. Van deze

hennen werden in totaal 320 eieren geïncubeerd, waarvan er 175 (54,7%) onvruchtbaar bleken. Van de overige 145 eieren kwamen er 122 kuikens zelfstandig uit het ei; ongeveer evenveel mannelijke als vrouwelijke kuikens.

Later werden meer resultaten gepubliceerd van een cytologisch onderzoek van parthenogenetisch ontwikkelde kiemschijven en embryo's van kalkoene-eieren (Kosin en Sato, 1960; Kosin, Sato en Nagra, 1962). Het aantal diploïde chromosomen werd bepaald op 72 voor hanen en 71 voor hennen. De grote moeilijkheid in het bepalen van de juiste aantallen is het feit, dat de enorme hoeveelheid verdeeld is in macro- en microchromosomen. Het zijn in het bijzonder de juiste aantallen van deze laatste groep, die zeer moeilijk te bepalen zijn aangezien zij niet van elkaar kunnen worden onderscheiden op basis van bijvoorbeeld grootte en/of vorm. Het exacte aantal is dan ook nog steeds niet met zekerheid vastgesteld. Wel is duidelijk, dat het op drie na grootste V-vormige chromosoom het geslachtschromosoom is omdat het bij hanen in tweevoud en bij hennen in enkelvoud voorkomt!

Evenals Poole en Olsen (1957) nemen Kosin en Sato waar, dat alle parthenogenetische kalkoene-embryo's van het mannelijk geslacht zijn. Ook Poole (1959) verrichtte onderzoek aan chromosomen van vier parthenogenetische en enige normale BSW kalkoenen. In tegenstelling tot Kosin en Sato (1960) is Poole van mening, dat het geslachtschromosoom het op vijf na grootste chromosoom is. Wel neemt Poole waar, dat het bij hanen gepaard voorkomt en bij hennen in enkelvoud aanwezig is, zodat zij zeer waarschijnlijk hetzelfde chromosoom bedoelen. Poole concludeert, dat er geen verschillen zijn tussen de chromosomen van normale en parthenogenetische kalkoenen: "Therefore, the parthenogenetic turkey is considered diploid..."

In 1960 beschrijven Kosin en Sato (1960) typische voorbeelden van macroscopische en microscopische afwijkingen in zich parthenogenetisch ontwikkelende eieren. Gedurende zeven dagen werden eieren geïncubeerd bij 37,5 graden Celsius en daarna onderzocht op tekenen van parthenogenetische ontwikkeling door ze tegen het licht te houden en te controleren op de aanwezigheid van bloedvaten en bloedcellen. Eieren, welke levende embryo's bevatten, werden teruggeplaatst in de incubator en daarna dagelijks gecontroleerd op verdere ontwikkeling. Zodra hiervan geen sprake meer was werden de eieren gefixeerd voor nader microscopisch onderzoek. Wederom werd vastgesteld, dat er slechts in weinig gevallen sprake was van werkelijke embryonale ontwikkelingen: bij 2.230 geïncubeerde eieren (gedurende 7 dagen) ontwikkelde de kiemschijf zich bij slechts 290 eieren, waarvan er bij 228 sprake was van uitsluitend membraanvorming. Bij slechts 29 eieren werd bloedvorming en een embryonale ontwikkeling waargenomen. Het membraanachtig gevormde weefsel was onregelmatig en ongelijk in dikte en werd geïnterpreteerd als zijnde ecto- en endodermale lagen. Bij de meer gevorderde membraanontwikkeling konden ook mesodermale elementen worden

geïdentificeerd. Een van de meest voorkomende afwijkingen was de aanwezigheid van ectodermale uitstulpingen, welke werden toegeschreven aan een ongelijke groeisnelheid van ectoderm enerzijds en meso- en endoderm anderzijds. Wanneer zich echter embryo's ontwikkelden, dan bezaten zij meestal macroscopisch waarneembare afwijkingen. De meest voorkomende afwijking was het onvolledig sluiten van de neurale buis terwijl de ontwikkeling altijd sterk vertraagd was. Ook werden opvallend veel tweelingen waargenomen, waarschijnlijk als gevolg van deze vertraagde ontwikkeling.

Stockard (1921) schrijft het ontstaan van tweelingen namelijk toe aan het nog niet bereikt hebben van het gastrula stadium ten tijde van het eieren leggen. Gezien de vertraagde ontwikkelingen van zich parthenogenetisch ontwikkelende eieren is het waarschijnlijk, dat veel exemplaren in een pre-gastrula stadium gelegd worden en daardoor een verhoogd tweelingen-percentage vertonen.

In een overzichtsartikel van Olsen (1960) de resultaten samen van negen jaar onderzoek en experimenten met meer dan 42.000 eieren van 926 kalkoenen. Door selectief kweken van BSW kalkoenen, die vanaf 1952 geselecteerd waren op het veelvuldig optreden van parthenogenese, werd een constante stijging in de parthenogenese - frequentie waargenomen. Ook het percentage uitgebroede eieren nam toe. Vanaf 1956 waren aldus 67 uitgebroede embryo's verkregen; vele leefden enige tijd en sommige werden zelfs volwassen. Het waren alle mannetjes en in het sperma van verschillende exemplaren werden goede, beweeglijke zaadcellen gevonden.

Olsen (1962 - C) vergeleek de percentages tweelingen van 1.217 zich parthenogenetisch ontwikkelende en 5.504 normaal bevruchte eieren; er werden respectievelijk 64 (5,3%) en 0,96% complete of incomplete tweelingen gevonden. Echter bij onderzoek van zich parthenogenetisch ontwikkelende eieren van hennen, die niet geselecteerd waren op basis van het frequente optreden van parthenogenese, werden 14,4% tweelingen gevonden, derhalve bijna driemaal zoveel. Als mogelijke oorzaak wordt genoemd de beschadiging en/of scheiding van cellen in vroege ontwikkelingsstadia als gevolg van het regelmatig draaien van de eieren.

Om na te gaan in hoeverre parthenogenese optreedt in onbevruchte eieren van met hoendersperma geïnsemineerde kalkoenen werd door Olsen (1962 - B) een studie gemaakt met behulp van een genetische kleurcode. Hiertoe werden onder andere 148 BSW - hennen, geselecteerd op hoge percentages gevorderde parthenogenetische ontwikkelingen, geïnsemineerd met sperma van Dark Cornish kippen. De kleur van de vederdos van de Dark Cornish hennen is dominant over het recessieve wit van de BSW - hennen. Aan de hand van de kleur kon worden bepaald, dat ongeveer 20% van de 15 of meer dagen oude embryo's was ontstaan uit onbevruchte eieren en zich dus parthenogenetisch had ontwikkeld. Ondanks het feit, dat men uitging van een op parthenogenese geselecteerde stam en de

inseminatie met soortvreemd sperma geschiedde (kippe – sperma), meent Olsen hieruit toch te kunnen concluderen, dat een parthenogenetische ontwikkeling ook kan plaatsvinden in eieren van normaal bevruchte kalkoenen. Dit feit en het feit, dat parthenogenese tijdens of vlak na de ovulatie begint, kan een gedeeltelijke verklaring zijn voor het hoge percentage onvruchtbare eieren, dat jaarlijks bij de kalkoenfokkerijen zulke grote financiële verliezen tot gevolg heeft.

De eerste huidtransplantaties bij parthenogenetische vogels worden in 1962 beschreven door Healy et al. (1962). Zij voerden transplantaties uit tussen zowel moeder en parthenogenetische zonen als parthenogenetische broers onderling. Alle controle – transplantaten van de moeder op "normale" zonen en omgekeerd werden, zoals verwacht, afgestoten. Bovendien traden afstotings – reacties op bij transplantaten van de moeder naar de parthenogenetische zonen. In sterke tegenstelling met al deze afstotingsreacties werd in geen enkele omgekeerde transplantatie, dus van parthenogenetische zoon naar de moeder een dergelijke reactie waargenomen. Transplantaten tussen twee parthenogenetische broers werden binnen respectievelijk 9 en 12 dagen afgestoten, waaruit blijkt, dat er geen sprake is van histocompatibiliteit. Ook deze reactie is te verwachten wanneer men aanneemt, dat de parthenogenonten ontstaan uit gameten welke zich ontwikkelen uit een niet – homozygote ouder, waarna een bepaalde vorm van chromosoomverdubbeling optreedt.

Door dezelfde groep onderzoekers werden in 1963 (Poole et al., 1963) experimenten uitgevoerd met de bedoeling om meer inzicht te verkrijgen in de cytologische processen, die voor of tijdens de parthenogenetische ontwikkeling plaatsvinden en resulteren in het herstel van de diploidie. Daartoe werden huidtransplantaties uitgevoerd met drie parthenogenetisch ontwikkelde BSW – hanen naar nakomelingen van niet – verwante BSW – hennen. Het onderzoek bestond uit twee experimenten. In het eerste experiment werden de transplantaties herhaald twaalf weken nadat de eerste transplantaten waren afgestoten. In deze periode was het immuniteitsniveau zo gedaald, dat er in de tweede serie transplantaten wederom vascularisatie kon plaatsvinden en ongeveer even lang kon overleven als de eerste serie. In het tweede experiment werd deze tussenliggende periode teruggebracht tot twee weken. Dit, aldus Poole en medewerkers, omdat men dan het hoogste immuniteitsniveau kan verwachten. In het eerste experiment was het transplantaat bij een recipiënt succesvol en na 304 dagen nog steeds intact. Een ander transplantaat bij deze recipiënt tijdens de tweede serie transplantaties mislukte helaas om technische redenen. Alle overige transplantaten in het eerste experiment werden afgestoten. In het tweede experiment waren bij een recipiënt de transplantaten uit zowel de eerste als de tweede serie succesvol, hoewel de transplantaten van twee verschillende donoren afkomstig waren. De overige (zeven) transplantaten uit het tweede experiment werden afgestoten: in de eerste serie na gemiddeld 14 dagen, terwijl er in de tweede serie in het geheel geen vascularisatie werd waargenomen, maar een snelle verschrompeling optrad. Op grond van de

reactie en de resultaten van het eerste experiment, achtten Poole et al. het bewezen, dat de transplantaten in deze laatste serie afgestoten werden door een actief verkregen transplantatie-immuniteit. Het weefsel van de parthenogenetische donor moet dus antigenen bevat hebben, welke vreemd waren voor het nageslacht. Uit het feit, dat een transplantatie slaagde terwijl andere transplantaten werden afgestoten concluderen Poole et al., dat er segregatie is opgetreden voor tenminste een heterozygoot antigeen – locus. Op grond van deze aangetoonde heterozygotie menen Poole et al, dat de meest waarschijnlijke weg voor herstel van de diploidie tijdens de parthenogenetische ontwikkeling te vinden is in onderdrukking van de afsnoering van het tweede poollichaampje (of een recombinatie van het haploïde tweede poollichaampje en de haploïde oöcyt).

Later werd verder bewijs voor heterozygotie door Poole (1965) geleverd met behulp van dezelfde technieken. In deze experimenten werden twee parthenogenonten gekruist met hun moeder, hetgeen in respectievelijk 7 en 4 nakomelingen resulteerde. Het huidtransplantaat van de eerste donor werd bij drie nakomelingen geaccepteerd en bij vier afgestoten; dat van de tweede donor tweemaal geaccepteerd en tweemaal afgestoten. Op grond van deze resultaten is het uit te sluiten, dat de afstotingsreacties uit de eerste experimenten (Poole et al., 1963) toegeschreven zouden kunnen worden aan het feit, dat de parthenogenetisch ontwikkelde hanen niet van die hen afstamden, die gebruikt was voor het verkrijgen van het voor de experimenten noodzakelijk nageslacht van gegevens over 1.301 kalkoenen en 66.966 (!) eieren. Parthenogenetische ontwikkelingen werden in drie categorieën onderverdeeld:

- 1) uitsluitend membraanvorming,
- 2) membraan – en bloedvorming, en
- 3) werkelijke embryovorming

Het percentage waargenomen parthenogenetische ontwikkelingen van deze drie categorieën tezamen steeg van ruim 15% in 1952 tot ongeveer 45% in 1963. Na een aanvankelijke snelle stijging van 1952 tot 1958 vlakt de curve na 1958 af en lijkt zich rond de 45% te stabiliseren. Wel treden aanzienlijke verschuivingen op in de onderlinge verhoudingen van de drie categorieën, waarbij met name de derde categorie, "embryo's", een nog steeds toenemend percentage vertoont, te weten van circa 1% in 1952 tot bijna 30% in 1963. De tweede categorie, "bloed – en membraanvorming", vertoont hetzelfde patroon, zij het op een iets lager niveau, terwijl de eerste categorie, "membraanvorming", een continu dalend percentage ten opzichte van de beide andere categorieën laat zien, namelijk van 95% naar ongeveer 45%. Berekend voor vier leeftijdsgroepen geeft Olsen eveneens het verloop van de percentages verkregen parthenogenetische kuikens, te weten:

- 1) (uit het ei gekomen) kuikens, die slechts een dag in leven blijven,
- 2) kuikens, die 2 – 10 dagen oud worden,
- 3) kuikens, die 11 – 20 dagen oud worden, en
- 4) kuikens, die 21 – 28 dagen oud worden.

Uit het verloop van de voor deze leeftijdsgroepen gevonden percentages blijkt, dat

de oudste groep een nog steeds stijgend percentage vertoont, terwijl de 2 – 10 dagen oude kuikens percentagegewijs steeds minder voorkomen, met andere woorden de parthenogenonten worden gemiddeld steeds ouder.

In 1966 publiceert Olsen (1966 – A) een vergelijkend onderzoek naar het voorkomen van natuurlijke parthenogenese bij 698 kippen van 18 verschillende kippestammen en kruisingen. Verse, onbevuchte eieren werden 8 – 10 dagen geïncubeerd (temperatuur 37,5 graden Celsius relatieve vochtigheid: 57%) en vervolgens macroscopisch onderzocht op parthenogenetische ontwikkeling. Het hoogste percentage parthenogenese werd gevonden bij de "Dark Cornish of the Beltsville strain" (6,38%), terwijl 1.136 van de 1.143 eieren, die parthenogenese vertoonden, afkomstig waren van kruisingen met "Dark Cornish", "Silver Cornish" en "Cornish") Dit duidt op het bestaan van, aan kruisingen gebonden, onderlinge stamverschillen voor parthenogenese. Er werd in geen enkel geval parthenogenese waargenomen bij eieren van "Araucana", "New Hampshire" en "Game" kippen. Slechts zeven van de 9.515 eieren van de "Barred Plymouth Rocks" en "Rhode Island Reds", vertoonden partheno – genetische ontwikkelingen.

Olsen (1966 – C) maakt melding van een klein onderzoek naar de mogelijke invloed van een virale infectie op parthenogenese bij kippen. Dit onderzoek werd min of meer door het toeval veroorzaakt doordat er bij een groep van 200 dieren, die geïsoleerd waren voor onderzoek naar hun weerstand tegen hoge zomertemperaturen, een zeer zware infectie uitbrak, die een viscerale lymphomatosis ("VL") bleek te zijn. Slechts 37 dieren overleefden de ziekte en konden hierna getest worden op een mogelijk veranderde frequentie van parthenogenese. Vier hennen bleken na de infectie een aanzienlijk aantal eieren te produceren met parthenogenetische ontwikkelingen; bij één hen bedroeg het percentage zelfs 37,5%. Met deze hennen werd een serie kweken uitgevoerd om na te gaan of deze, kennelijk met de virus – infectie verbandhoudende, verandering doorgegeven zou worden aan het nageslacht. Bovendien werd nagegaan of verschillende hanen een duidelijke invloed zouden uitoefenen op het voorkomen van parthenogenese bij de eieren van de dochters. De acht dochters van de hen met het hoogste percentage parthenogenese bij de eieren en een Dark Cornish haan vertoonden in 13,7 – 57% (gemiddeld 32,8%) van de eieren beperkte, ongeorganiseerde parthenogenetische ontwikkelingen. In de tweede generatie was het gemiddelde percentage nog slechts 11,2% en in de derde, vierde en vijfde generatie respectievelijk 15,0; 14,1 en 19,7%. Werde echter bij deze drie generaties een andere haan dan het Dark Cornish exemplaar gebruikt voor de kruisings – experimenten, dan waren de percentages respectievelijk 0,2; 0,7 en 0,6% en bij de controle – experimenten (DC x DC) respectievelijk 5,8; 18,9 en 17,2%.

Op grond van deze resultaten concludeert Olsen, dat er tenminste enig bewijs is voor een mogelijk verband tussen een LV infectie en het ontstaan van parthenogenetische ontwikkelingen. Via welk mechanisme het virus dit effect veroorzaakt is niet



duidelijk. Immers, niet alle dieren reageren op dezelfde wijze en slechts in één hen werd de verhoogde parthenogenese aan elk van haar acht dochters doorgegeven (later bleek deze verhoging constant te blijven tot in de huidige 5de generatie). In dit geval lijkt een veranderde genetische constitutie aannemelijk.

Nader onderzoek werd door Olsen en Buss (1967) verricht bij twee groepen "Pozo Gray" (P.G.) kalkoenen, die elk uit 16 zusterparen bestonden en dus genetisch gelijk waren. De ene groep werd wel, de andere niet, gevaccineerd met kippepokkenvirus. Voor deze experimenten werden P.G. kalkoenen gebruikt omdat ze zo weinig parthenogenetische ontwikkelingen vertonen: 1 tot 2%. Van de 780 onderzochte eieren van de gevaccineerde groep vertoonde gemiddeld 4,0% parthenogenese; van de 474 eieren van de controlegroep 1,1%. Uit beide groepen werden de nakomelingen van twee zusterparen met een, in beide groepen hoog percentage parthenogenetische ei-ontwikkelingen (respectievelijk 15,1 en 11,4% en 3,1 en 3,0%), geselecteerd voor verdere kweek-experimenten. Tevens werden de nakomelingen van een derde hen uit de gevaccineerde groep voor verdere kweek gebruikt. Daar deze hen 13,0% en de zuster uit de controlegroep 0% parthenogenese vertoonden, werd het laatstgenoemde dier verder buiten de selectieve kweek gehouden. Op dezelfde wijze werd vijf achtereenvolgende jaren verder gekweekt. Gedurende deze jaren bedroeg het percentage eieren met parthenogenetische ontwikkelingen van de gevaccineerde groep: 4,0; 7,1; 8,5; 16,6 en 21,1% en van de de controlegroep: 1,1; 5,2; 7,0; 8,6 en 18,6%. Ook werd in de controlegroep tegen parthenogenese geselecteerd; de lijn vertoonde respectievelijk 1,1; 1,2; 1,1; 0,3 en 1,0% parthenogenese. Deze resultaten tonen aan, dat zowel genetische factoren als het levende kippepokken-virus een actieve rol spelen in het optreden van parthenogenetische ontwikkelingen. Het genetische aspect blijkt duidelijk uit de stijging in het percentage parthenogenese van de selectieve kweek in de controlegroep, namelijk van 1,1% in 1962 tot 18,6% in 1966. De wijze, waarop het DNA-virus zijn invloed op de onbevuchte eieren uitoefent, is nog niet duidelijk. De toename van het percentage parthenogenese komt met name door het grotere aantal levende embryo's, dat wordt verkregen, hetgeen suggereert, dat het virus niet alleen een "organiserende rol" vervult, maar ook een stimulator is voor verdere celproliferatie.

Darcey en Buss (1968) onderzochten in hoeverre een abnormale oögenese, welke resulteert in een ongereduceerde oöcyt, de basis vormt voor diploïde parthenogenese. Zij vonden aanwijzingen, dat parthenogenese in een haploïde eicel begint en dat tijdens een bepaald stadium in de ontwikkeling het diploïde aantal chromosomen hersteld wordt en er dus diploïde parthenogenonten ontstaan. Deze resultaten worden later uitgebreider beschreven (Darcey et al., 1971). Tijdens vroege parthenogenetische ontwikkeling worden drie typen van cellen waargenomen: haploïde-, diploïde- en aneuploïde- of polyploïde cellen. In 63% van de onderzochte kiemschijven kwamen meer haploïde dan diploïde cellen voor. Zes, op het voorkomen van parthenogenese, geselecteerde hennen vertoonden 49, 65, 58, 45,

51 en 55% parthenogenese; na inseminatie vertoonden deze zelfde hennen 94, 100, 94, 100, 95 en 80% vruchtbaarheid. Het hoge percentage parthenogenese enerzijds en de latere vruchtbaarheid, resulterend in normale diploïde embryo's, anderzijds zouden bij deze onderzochte embryo's afwijkingen tot gevolg moeten hebben (bijvoorbeeld triploïdie) indien parthenogenese veroorzaakt zou worden door een abnormale oögenese.

Olsen, Wilson en Marks (1968) onderzochten de genetische controle van het voorkomen van parthenogenetische ontwikkeling bij kippen met behulp van de F-2 en terugkruisingsmethode. Zij testten de hypothese, dat een dergelijke controle een enkel, autosomaal recessief, locus zou zijn met modifierende genen, die de frequentie van parthenogenetische ontwikkeling van eieren van "positieve testers" zou bepalen. Op grond van het feit, dat de kweekresultaten weinig afweken van de op basis van bovengenoemde hypothese te verwachten resultaten concludeerde men, dat er geen aanwijzingen zijn om deze hypothese te verwerpen.

Een positieve correlatie tussen de frequentie van het optreden van parthenogenese in onbevuchte eieren en het percentage van deze eieren, dat werkelijke embryo's voortbrengt, werd door Olsen (1969 - A) vastgesteld. Een analyse van 13.272 eieren van totaal 280 maagdelijke hennen toonde aan, dat dieren, die het hoogste percentage partheno genetische ei - ontwikkelingen vertonen, proportioneel ook het hoogste percentage embryo's vormen en omgekeerd! In een vergelijkende studie van het lichaamsgewicht en de lengte van parthenogenetische en normale embryo's tussen de negende en vijf - en - twintigste dag van de incubatie vindt Olsen (1969 - B), dat de "normale" embryo's tijdens de gehele incubatieperiode zowel zwaarder als langer zijn. Olsen schrijft dit verschil toe aan de karakteristieke vertraging, welke aan het begin van de parthenogenetische ontwikkeling optreedt (Olsen, 1965).

Olsen (1969 - C en 1974) noemt vier terreinen van biologisch onderzoek, waarin de parthenogenetische ontwikkeling als een waardevol hulpmiddel kan worden gebruikt bij:

- 1) studies van de vroege embryonale ontwikkelingsstadia en de mechanismen, welke tot het (voor de verdere ontwikkeling noodzakelijke?) herstel van de diploïdie leiden
- 2) onderzoek naar de immuno - respons van huid - en orgaantransplantaties
- 3) het opsporen en elimineren van ongewenste lethale genen, welke in heterozygote vorm door de moeder gedragen worden;
- 4) het ontwikkelen van ingeteelde stammen.

Tenslotte vergelijkt Olsen (1970) de gewichten van hart, lever, testes, milt en schildklier van 21 parthenogenetische en 21 "normale" embryo's. De eieren van de laatste groep werden 48 uur korter geïncubeerd als compensatie voor de reeds eerder waargenomen vertraagde groei van de parthenogenonten, terwijl alle

orgaangewichten gecorrigeerd werden naar embryogewicht. De gemiddelde gewichten van de testis, milt en schildklier van de parthenogenetische embryo's waren beduidend lager, maar die van het hart en de lever waren respectievelijk een weinig en aanzienlijk hoger dan de gemiddelde gewichten van de normale embryo's, namelijk achtereenvolgens: 8,6 – 2,5; 15,6 – 12,6; 6,7 – 4,4; 234,8 – 257,2 en 830,5 en 966,0 mg. Zeer opvallend was het grote verschil tussen het gemiddelde testisgewicht van de normale embryo's en dat van de parthenogenonten: respectievelijk 8,6 en 2,5 mg. Bovendien was er een aanzienlijke variatie in de individuele testisgewichten bij de laatste groep: 0,9 – 8,7 mg, ongeveer een tienvoud. Het is dus niet toevallig, dat het juist de testis is, die bij volwassen dieren het orgaan vormt, dat het meest met zo'n wisselend resultaat – en vaak in het geheel niet – functioneert.

Abdel – Hameed en Shaffner (1971) verrichtten microscopisch onderzoek van de voortplantingsorganen van zeven tweeslachtige kippen, die deel uitmaakten van een groep van 15 dieren, die afkomstig waren van een commerciële kippenboerderij. In een dergelijk commercieel bedrijf worden na het uitkomen van de eieren de mannelijke kuikens uit het broedsel verwijderd opdat alleen de hennen overblijven. Wanneer de dieren de geslachtsrijpe leeftijd bereiken worden er incidenteel nog hanen uitgehaald, die tijdens de eerste controle gemist zijn. Tijdens deze controles bleek, dat er ook tweeslachtige dieren voorkwamen met een frequentie van ongeveer 1 op 2.000 hennen. Nader onderzoek toonde aan, dat er – op grond van het karyotype – twee aparte groepen waren: een triploïde 3AZZW groep en een mozaïekgroep. De ontwikkeling van deze laatste groep laat zich vrij gemakkelijk verklaren, maar voor de homozygote triploïde dieren met de ZZW geslachtschromosomen – constitutie ligt een verklaring minder voor de hand. Histologisch onderzoek van de gonaden wees uit, dat er slechts testisweefsel aanwezig was, zodat er geen sprake was van ovotestes, maar van slecht gevormde testes zonder waarneembare spermatogene activiteit. In dit verband kan opgemerkt worden, dat reeds beschreven was (Narbaik en Robertis, 1970), dat een estradiolbenzoaat behandeling tijdens de embryonale groei een geslachtsverandering induceert, waarbij het zich snel delende testiculaire weefsel het degenererende ovariële weefsel vervangt. De beschreven triploïde kippen zouden op soortgelijke wijze kunnen ontstaan onder invloed van de eigen wisselende concentraties mannelijke en vrouwelijke hormonen, welke veroorzaakt zouden worden door de afwijkende chromosomen – constitutie.

Hoewel reeds eerder een volwassen parthenogenetische triploïde kip beschreven was (Sarvella, 1970) achten Abdel – Hameed en Shaffner het ook mogelijk, dat deze triploïde kippen ontstaan zijn door bevruchting van een ongereduceerd ei (2A – ZW) door een normale haploïde zaadcel (1A – Z) of als resultaat van een ongereduceerde zaadcel (2AZZ) en een normaal ei (1A – Z of 1A – W) dan wel door dubbele bevruchting van een normaal ei (1A – Z of 1A – W) door twee haploïde zaadcellen. Ondanks het feit, dat er zich tussen dertien geanalyseerde triploïde

dieren geen enkel 3A-ZZZ type bevond en men op grond van bovenstaande verklaring een ongeveer gelijk aantal 3A-ZZW en 3A-ZZZ exemplaren zou verwachten, is het mogelijk, dat dit ontbrekende type wel aanwezig was, doch reeds tijdens het selecteren van de hennen op grond van het mannelijke uiterlijk was verwijderd.

Tijdens het 12de internationale congres over genetica maken Sarvella en Gehman (1968) melding van het feit, dat — door middel van parthenogenese — er zich bij eieren met twee dooiers membranen vormen in zowel een als beide dooiers. Het percentage dooiers, dat parthenogenetische membranen vormde, werd vergeleken met het percentage parthenogenese bij één — dooierige eieren van dezelfde hennen. Het viel op, dat het percentage van de eieren met twee dooiers aanzienlijk hoger was, hetgeen doet vermoeden, dat de dooiers elkaar op de een of andere wijze beïnvloeden. Tweemaal bevroren en ontdooide, ruwe parthenogenetische membraanstukjes veroorzaakten eveneens een aanzienlijke verhoging van parthenogenese ten opzichte van controles. Dit onderzoek wordt in uitgebreide vorm later nogmaals gepubliceerd (Sarvella en Gehman, 1975 — B).

Sarvella (1971 — A) vond in een Dark Cornish kippenkweek, welke geselecteerd was op een hoge frequentie parthenogenetische eieren, in 63% van de onbevuchte eieren membraanvorming en in 2,1% embryo's; 24% van alle onderzochte hennen produceerde tenminste een onbevucht ei met een embryo. Het aantal chromosomen per ei varieerde gedurende de eerste vijf dagen sterk van haploïd tot octaploïd hoger. Fehchheimer et al (1968) vonden een haploïd embryo in een ei van een geïnsemineerde hen nadat dit 18 uur geïncubeerd was.

Bloom (1969 en 1970) onderzocht de chromosoomaantallen bij ruim 2000 kippe — embryo's ("Single Comb White Leghorn") en vond in totaal 15 haploïde embryo's. Omdat er bij ongeveer 1000 onderzochte onbevuchte eieren na 10 dagen incubatie geen enkele ontwikkeling werd waargenomen en de bovengenoemde haploïde embryo's afkomstig waren van bevruchte hennen, concludeerde Bloom, dat er geen sprake was van parthenogenese, maar dat de mannelijke zaadcel een bijdrage leverde aan de ontwikkeling van de haploïde embryo's — waarschijnlijk in de vorm van gynogenese. Voor een verklaring van deze waarnemingen wordt door Bloom volstaan met een verwijzing naar de door Beatty (1957) opgesomde theoretische mogelijkheden. Er wordt slechts geconcludeerd, dat het haploïde genoom kennelijk voldoende genetische informatie bevat om tenminste de vroege embryonale ontwikkeling tot stand te brengen.

Sarvella (1971 — B) bestudeerde ook de cytologische ontwikkeling van parthenogenese bij kalkoene — eieren, welke op verschillende plaatsen uit het oviduct werden verwijderd en vervolgens maximaal zeven dagen werden geïncubeerd. Tot acht uur na het leggen van het voorafgaande ei werd weinig ontwikkeling waargenomen. Daarna ontstaan de eerste cellen, welke diploïd lijken

op grond van kerngrootte en metafase platen. Na de eerste paar delingen ontstaan de afwijkingen en worden haploïde, tetraploïde of hogere ploïde cellen waargenomen. Tijdens de tweede incubatiedag wordt een extreme fragmentatie van het chromatine waargenomen. In deze periode wordt het mogelijke ontstaan van embryo's waarschijnlijk bepaald: indien het chromosomen - aantal bijna normaal is delen de cellen verder en kunnen groepen cellen een of meer embryo's vormen. Er lijken dus twee kritieke perioden voor parthenogenetische embryonale ontwikkeling te bestaan: ten eerste de vroege verdubbeling van het haploïde aantal chromosomen en ten tweede de mogelijke fragmentatie van de chromosomen.

Tevens verricht Sarvella (1971 - C) onderzoek naar parthenogenese na inseminatie met radioactief bestraald sperma. Dit is echter zuiver experimenteel werk en valt dus buiten de context van dit overzicht.

In 1973 wordt door Sarvella (1973) als eerste melding gemaakt van vier parthenogenetisch ontwikkelde, diploïde kippen, die het volwassen stadium bereiken. Deze vier kippen van het Dark Cornish type waren afkomstig uit een serie van 8.532 eieren. Een van de vier parthenogenonten werd met een Leghorn hen gekruist, die naderhand door de parthenogenont normaal bevruchte eieren legde.

In een vergelijkend onderzoek naar de testes van normale en parthenogenetische kalkoenen worden de door Olsen (1970) gevonden verschillen in gewicht door Sarvella (1974) bevestigd in die zin, dat de afmetingen van de testes van parthenogenonten aanzienlijk kleiner bleken te zijn dan die van de controles; gemiddeld respectievelijk  $1,9 \times 1,7$  en  $4,6 \times 4,1$  cm. Tevens werd microscopisch onderzoek verricht aan testes van parthenogenonten. Het bleek, dat er van de 37 bestudeerde testes slechts negen rijp sperma bevatten. In de overige testes was de spermatogenese onvolledig en bij twee dieren ontbrak zij geheel.

In een slecht opgezet onderzoek probeerde Sarvella (1974 - B) mogelijke correlaties te vinden tussen de verschillen in parthenogenese - frequenties en bepaalde uitwendige milieufactoren. Het bleek, dat de ontwikkeling van parthenogenetische embryo's beïnvloed wordt door het jaargetijde. In de maanden april en mei werd een hoger percentage gevonden. Andere factoren zoals de volgorde van het ei in het broedsel, de geboortedatum van de hen en de buitentemperatuur gaven geen vaste jaarlijkse veranderingen. De op zichzelf al dubieuze slotconclusie ("Environmental influences, therefore, seemed to be present. It was rather hard to determine which ones were significant as none were consistently significant") is mogelijk nog onjuist wanneer we in aanmerking nemen, dat het bepalen van het al dan niet optreden van parthenogenese macroscopisch verricht werd. Sarvella zelf zegt hierover: "If slides could be made of each egg, an entirely different result might have been obtained."

Sarvella (1975 - A) nam waar, dat bij bepaalde hennen uit een "parthenogenetische Dark Cornish lijn" het percentage eieren met twee dooiers was toegenomen. Naar

aanleiding van deze waarneming werd een kweek opgezet, die geselecteerd werd op eieren met twee dooiers in zowel eieren met een hoog als een laag percentage parthenogenetische eiontwikkeling, respectievelijk "DY high" en "DY low". In deze kweken werden veel eieren met drie dooiers waargenomen en zelfs een met vier dooiers. De reeds bestaande kweken, welke uitsluitend op of tegen parthenogenese werden geselecteerd, werden uiteraard ook voortgezet: respectievelijk "high" en "low lines". Totaal werden dus vier kweken geanalyseerd: DY high, DY low, high en low. Het gemiddelde percentage parthenogenese werd op basis van het aantal dooiers berekend: over een periode van drie jaren bleef dit voor alle vier groepen ongeveer gelijk. Wel werd een beduidende stijging waargenomen in het aantal eieren met twee dooiers, dat een parthenogenetische ontwikkeling vertoonde in de "DY high" groep ten opzichte van de "high" groep. Het blijkt dus, dat men met succes niet alleen op het voorkomen van parthenogenese en het voorkomen van eieren met twee dooiers kan kweken, maar ook op het voorkomen van een combinatie van deze beide criteria. Opgemerkt dient te worden, dat het artikel zeer onduidelijk is geschreven; dat men numeriek niet – vergelijkbare groepen wel met elkaar vergelijkt en dat Sarvella zelf geen enkele conclusie trekt uit de waarnemingen.

Schom et al. (1971) onderzochten de invloed van een veranderd dag – nacht ritme (gedurende 11 weken slechts zes uur licht per dag) op de eiproductie en het voorkomen van parthenogenese in die eieren. Er bleek een positief verband te bestaan tussen de waarnemingen voor en na deze korte lichtperiode. Tijdens beide waarnemingsperioden bleek er een negatief verband te zijn tussen de minimum dagtemperatuur juist voor de ovulatie en parthenogenetische ei – ontwikkelingen.

In een ander onderzoek van dezelfde groep (Schom et al., 1972) werden correlatie – coëfficiënten berekend tussen het voorkomen van parthenogenese en de eiproductie, vruchtbaarheid, het uitkomen van de eieren en de geslachtsverhouding. De laatste drie bepalingen werden verricht na inseminatie van de hennen. Er lijkt een positief verband te bestaan tussen de eiproductie/vruchtbaarheid en het voorkomen van parthenogenese. De overige factoren vertoonden een te verwaarlozen verband met het voorkomen van parthenogenese. Er worden geen nadere bijzonderheden en/of getallen in dit excerpt vermeld, maar wel het feit, dat de waarnemingen werden verricht aan kalkoenen, die niet uit een op parthenogenese geselecteerde kweek afkomstig waren en ingeënt tegen pokken.

Olsen en Buss (1972) verzamelden de gegevens van de donskleur van 1.386 parthenogenonten van 306 bronskleurige kalkoenhennen, die alle heterozygoot waren in het genenpaar, dat de verenpigmentatie bepaalde. De helft van de parthenogenonten (669) was wit, de andere helft (717) gekleurd. Vervolgens werden 89 van de 306 heterozygote hennen geïnsemineerd met semen van homozygote hanen (CC); er werden 233 witte en 239 gekleurde nakomelingen waargenomen. Deze gelijke kleurverhouding tussen parthenogenonten enerzijds en normale embryo's en kuikens anderzijds bewijst, dat in beide gevallen de twee allelen gelijk

segregeren en ondersteunt de suggestie van Darcey et al. (1971), dat de parthenogenonten waarschijnlijk uit haploïde eicellen ontstaan. Tevens kan een van de vier mogelijke routes voor het herstellen van het diploïde chromosoomaantal (onderdrukken van de afsnoering van – of het versmelten met – het eerste poollichaampje) worden uitgesloten. Twee andere mogelijke routes (kerndeling bij de eerste mitosedeling zonder plasma – deling en de fusie van twee haploïde mitotische producten) zijn eveneens onwaarschijnlijk omdat deze in homozygote parthenogenonten moeten resulteren en reeds aangetoond is, dat parthenogenonten heterozygoot kunnen zijn voor een of meer loci, welke het immuunsysteem controleren (Poole et al., 1963; Poole, 1965) alsmede voor het locus, dat de bronskleur van de veren controleert (Olsen, 1966). Op grond van deze gegevens concludeert men, dat de diploïdie het resultaat is van de onderdrukking van de afsnoering van het tweede poollichaampje.

In 1972 publiceert Zartman (1972) de resultaten van een cytologisch onderzoek aan een parthenogenetisch ontwikkeld Dark Cornish kippe – embryo. Na een injectie (colchicine 0,1%) in de dooier werd het embryo geïsoleerd voor een macrochromosoom – onderzoek. In alle onderzochte metafase – figuren werd een translocatie gevonden van een segment van chromosoom 3 naar chromosoom 1. Doordat de hen voor de uiteindelijke waarneming van de translocatie reeds uit de kweek was verwijderd en niet meer in het laboratorium aanwezig, konden geen analyses meer verricht worden van de somatische chromosoom – samenstelling. Het belang van deze waarneming vindt Zartman het feit, dat het een aannemelijke ontstaansmogelijkheid demonstreert voor de vele typen spontane 1ste generatietranslocaties, die in verschillende organismen zijn waargenomen.

In 1974 publiceert Olsen (1974) een overzichtsartikel over de cytologische aspecten van parthenogenese in kalkoene – eieren. In dit artikel worden geen nieuwe gegevens vermeld. Wel is dat het geval bij een artikel van DeFord en medewerkers (DeFord et al., 1979), waarin de hypothese wordt getest, dat parthenogenese bij kalkoenen (BSW) begint in een haploïde eicel en dat er na de meiose een verdubbeling van de ploïdie optreedt. Met behulp van een kwantitatief cytofluorometrisch onderzoek werd deze hypothese bevestigd. Daartoe werden embryocelsuspensies van eieren van onbevuchte BSW hennen met acriflavine fluorescerend gekleurd, waarna de fluorescentie van de individuele celkernen werd gemeten. Op deze wijze werd een DNA verdeling verkregen van cellen van 59 dagen oude parthenogenonten. Uit de resultaten kon, behalve de bevestiging van bovengenoemde hypothese, tevens worden vastgesteld, dat het percentage haploïde en andere niet – diploïde cellen en de variatie in ploïdie van deze cellen afneemt bij een toenemende leeftijd van het embryo.

### II – 5.3 Samenvatting en conclusies

In hoofdstuk II – 5 wordt de literatuur besproken over natuurlijke, niet – zygogenetische ontwikkelingen bij vogels. De eerste waarnemingen van

embryonale ontwikkelingen bij onbevuchte eieren dateren reeds uit 1827. Een aanzienlijk aantal publicaties is verschenen tussen circa 1865 en 1925. Hoofdzaak in deze publicaties is de vraag in hoeverre deze waarnemingen het resultaat zijn van degeneratieve verschijnselen of in hoeverre er sprake is van parthenogenese. Voor — en tegenstanders wisselen elkaar geruime tijd af. Pas ruim een eeuw na de eerste waarnemingen wordt overeenstemming bereikt over het parthenogenetische karakter van de waargenomen ontwikkelingen.

In de vijftiger jaren werden opzienbarende resultaten bereikt door het selectief fokken van kalkoenen en later ook van kippen. In 1958 werd voor het eerst melding gemaakt van een parthenogenetisch ontwikkeld kalkoene— embryo dat het kuikenstadium had bereikt. De eerste parthenogenetisch ontwikkelde kippen worden pas in 1973 beschreven.

Tijdens de eerste dagen van de ontwikkeling werd een vertraagde ontwikkeling van de parthenogenonten waargenomen ten opzichte van de normale embryo's. Deze karakteristieke vertraging van 2 tot 3 dagen is het gevolg van een reorganisatieproces. De aanvankelijke ongeordende celgroei, die in een meerlagige in plaats van een éénlagige kienhuid (blastoderm) resulteert, wordt door meer levensvatbare blastomeren getransformeerd en gereorganiseerd tot een normale kienhuid.

Bij toeval, als gevolg van een natuurlijke virale infectie, werd ontdekt dat virussen een verhoogd percentage parthenogenetische ontwikkelingen tot gevolg hebben.

Met behulp van chromosoomtellingen kwam vast te staan dat de parthenogenonten diploïd zijn. Ander onderzoek wees uit dat, zowel bij kalkoenen als bij kippen, een verhoogd percentage tweelingen werd gevonden bij zich parthenogenetisch ontwikkelende eieren. Teneinde meer inzicht te krijgen in het mechanisme dat ten grondslag ligt aan het herstel van de diploïdie werden huidtransplantaties uitgevoerd. Op grond van de verkregen resultaten en die van kruisingen tussen dieren met verschillende kleurkenmerken wordt geconcludeerd dat de diploïdie een gevolg is van de onderdrukking van de afsnoering van het tweede poollichaampje.

Resumerend kan worden geconcludeerd dat er ook bij vogels een parthenogenetische wijze van voortplanten is aangetoond zowel bij kalkoenen als bij kippen. Door de afwijkende geslachtsbepaling bij deze klasse der gewervelde dieren — bij vogels is het mannetje homozygoot ten aanzien van het geslachtschromosoom — worden er bij deze parthenogenetische ontwikkelingen uitsluitend mannetjes verkregen. Hierdoor is het onmogelijk dat deze wijze van voortplanten de soort in stand kan houden. Er is dan ook zowel een zygogenetische als een parthenogenetische wijze van voortplanten bij dezelfde dieren mogelijk.



Eveneens afwijkend ten opzichte van de andere klassen der gewervelde dieren is het feit dat er bij deze vogels slechts volwassen parthenogenonten werden verkregen na jarenlang selectief fokken met dieren met een hoog percentage parthenogenetische embryonale ontwikkelingen. Strikt genomen kan men dus eigenlijk niet van natuurlijke parthenogenese spreken. Niettemin zijn er volwassen diploïde, parthenogenonten verkregen waarvan een bepaald gedeelte tevens fertiel bleek te zijn. Sommige aldus verkregen hanen produceerden namelijk bruikbare hoeveelheden sperma waarmede succesvolle inseminaties konden worden uitgevoerd.

## HOOFDSTUK II – 6

### NATUURLIJKE PARTHENOGENESE BIJ ZOOGDIEREN

#### II – 6.1 Inleiding

De zoogdieren vormen de enige klasse in het dierenrijk, waarvan tot op heden geen voorbeelden bekend zijn waarbij langs de weg van de natuurlijke parthenogenese volwassen individuen ontstaan. Er is dan ook relatief weinig literatuur over natuurlijke parthenogenese gepubliceerd, hetgeen in duidelijk contrast staat met de zeer uitgebreide literatuur over experimentele parthenogenese (Hoofdstuk III) en de talrijke beschrijvingen van technieken om deze vorm van parthenogenese te induceren. Er zijn echter wel diverse publikaties over waargenomen celdelingen van oöcyten en eicellen, die zich in respectievelijk de follikel en het oviduct verder zouden ontwikkelen. Het is evenwel reeds vanaf de eerste waarnemingen een twistpunt geweest of het hier nu het begin van een parthenogenetische ontwikkeling betrof of voorbeelden van follikel – atresie of eicelveroudering. De publicaties die over ovariële parthenogenese verschenen zijn, worden eerst behandeld. Vervolgens zullen teratomen worden besproken en tenslotte zal parthenogenese bij de geovuleerde eicellen worden beschreven. Parthenogenese bij de mens wordt apart beschreven in II – 7.

#### II – 6.2 Ovariële Parthenogenese of Follikelatresie ?

Vanaf de eerste waarnemingen van delingsfiguren in oöcyten bij zoogdieren is het lang een twistpunt geweest of het hier nu het begin van een parthenogenetische ontwikkeling betrof of dat er slechts sprake was van een normale veroudering van de oöcyt. De eerste waarnemingen dateren reeds uit 1863. In dat jaar publiceerde Pflüger (1863) de resultaten van studies van menselijke en zoogdier – ovaria. Het optreden van klievingsdelingen in degenererende ovariële oöcyten werd door hem als volgt beschreven: "Oft sieht man dann die Dotterkugel in zwei, drei, vier und mehr Parthien zerfallen, die ähnllich wie ein Furchung begriffenes Ei aussehen."

Hensen (1876) beschreef drie eicellen met poollichaampjes in ovaria van bruinvissen. Hoewel deze waarnemingen door onder andere Flemming (1885) in verband gebracht werden met parthenogenese, betrof het hier zeer waarschijnlijk een normaal gerijpte eicel omdat de waarnemingen gedaan werden bij Graafse follikels ("die Follikel waren sprungfertig").

Rein (1883) trof een grote kernspoelfiguur aan in een konijne – ovarium, terwijl Flemming (1885), eveneens in konijne – ovaria, bij tien oöcyten in degenererende follikels kernspoelen waarnam.

Later publiceerde Flemming (1897) talrijke afbeeldingen van spoelfiguren in oöcyten in atretische follikels. Hij was van mening, "dass es sich hier um einen ganz abnormen Kernteilungsprozess gehandelt haben wird".

Bellonci (1885) bestudeerde de rijping van oöcyten van de rat en de hond, en vond veel gesegmenteerde oöcyten in gedegenererde follikels. In sommige "twee – cellige" oöcyten meende hij kernen waar te nemen, terwijl deze bij meercellige stadia ontbraken. Tevens nam Bellonci talrijke kleine bolletjes waar rond de oöcyten, die op poollichaampjes leken. Het betrof hier waarschijnlijk cytoplasmatische uitstulpingen van de reeds gedegenererde celmembraan, zodat er sprake is van degeneratie en niet van parthenogenese.

Het werk, dat in het daaropvolgende decennium is verschenen, is door Bonnet (1899) samengevat in een uitgebreid overzichtsartikel onder de naam "Gibt es bei Wirbeltieren Parthenogenesis?" Uit dit artikel en de later verschenen literatuur blijkt, dat er ook toen nog verschil van mening bestond over het ware karakter van de waargenomen segmentaties bij onbevruichte oöcyten. Voorstanders zijn van mening, dat het hier rudimentaire vormen van parthenogenese betreft, terwijl tegenstanders menen, dat het slechts degeneratieve verschijnselen van follikelatresie zijn. Bonnet zelf is van mening, dat de door hem waargenomen mitosefiguren in oöcyten van atretische follikels "meer of minder normale rijpingsstadia zijn". Men kan echter niet van parthenogenetische processen spreken, aldus Bonnet, omdat het proces tot te veel in grootte verschillende "cellen" resulteert, die bovendien soms geen en soms een of meer kernen bezitten. Bovendien vertonen de cellen degeneratieve verschijnselen (onder andere vacuolevorming); vaak betreft het slechts fragmentatie.

Spuler (1901) is echter wel van mening, dat de door hem gevonden gedeelde eicellen in atretische follikels van muize – ovaria het begin van een parthenogenetische ontwikkeling vormen.

Ook Henneguy (1893, 1894) was van mening, dat er sprake was van "parthenogenetische fragmentatie" bij zijn waarnemingen aan ovaria van katten, ratten en muizen: "Le vitellus est divisé en quatre, cinq, six segments, tantôt à peu près égaux, tantôt de volume très différent. Plusieurs des fragments renferment des éléments chromatiques, répartis très irrégulièrement". Op grond van deze omschrijving kan geconcludeerd worden, dat hier dus slechts sprake was van degeneratie.

Janosik (1897) was daarentegen van mening, mede op grond van eigen onderzoek

aan ovaria van konijnen en cavia's, dat de oöcyten poollichaampjes kunnen vormen waarna de oöcyt zich in het ovarium zonder bevruchting verder kan delen. Daarbij kunnen "segmenten" van gelijke grootte ontstaan, die allen kernen bevatten of zij kunnen van verschillende grootte zijn en eveneens allemaal kernen bevatten. Deze "segmenten" hebben dus het karakter van cellen. Behalve deze werkelijke delingen komt er tevens, met name bij oudere dieren, fragmentatie van eicellen voor. Met deze beschrijving geeft Janosik blijk een paar opmerkelijk goede — en bovendien op juiste wijze geïnterpreteerde — waarnemingen gedaan te hebben. Dit is met name het geval bij de constatering, dat oöcyten eerst een poollichaampje vormen en daarna verder kunnen delen. Bovendien onderscheidde Janosik, op goede gronden, werkelijke celdelingen en fragmentatie.

In hetzelfde jaar beschreef Rabl (1897) "eine parthenogenetische Furchungsspindel" in een oöcyt met twee poollichaampjes. Hij deed deze waarnemingen bij cavia — ovaria. In andere follikels nam hij meervoudig gedeelde oöcyten waar, die soms wel en soms geen kern bevatten.

Twee jaar later beschreef hij (Rabl, 1899) atretische follikels, waarin de gedeelde oöcyten "als eine parthenogenetische Furchung aufgefasst werden muss". Van der Stricht (1901) beschreef een zescellig stadium in een vleermuis — ovarium en spreekt over "a beginning of true parthenogenesis".

Spieler (1901) achtte parthenogenese theoretisch mogelijk gezien zijn waarnemingen aan delingsspoelfiguren in ovariële cavia — oöcyten. Wel voegt hij aan deze opmerking toe, dat de delingen snel gevolgd worden door degeneratieve verschijnselen zoals onder andere fragmentatie en vacuolevorming.

De vele publikaties van Loeb (1901, 1905, 1911, 1912, 1915, 1923 en 1930) laten er geen twijfel over bestaan, dat het naar zijn mening parthenogenese in zoogdier — ovaria betreft. In 1905 beschreef Loeb zijn waarnemingen over follikelatresie in het ovarium van de bruinvis. In sommige ovaria werden mitose — figuren waargenomen in reeds gedeelde eicellen. Loeb is van mening, dat het hier mogelijk gevallen van parthenogenese betreft: "Es liegt kein Grund vor, warum diese Veränderungen nicht als der Anfang einer sehr bald zum Abschluss kommenden parthenogenetischen Entwicklung betrachtet werden sollen". Loeb (1911) spreekt over "early spontaneous parthenogenetic embryos" in ovaria van cavia's. Hij is zo overtuigd van de juistheid van zijn interpretatie, dat hij over een bepaald beeld schrijft, dat "There is present also a structure which is probably to be interpreted as a neural tube." Uit studies van ovaria van de cavia (Rubaschkin, 1906. Athias, 1909) en de muis (Kirkham, 1914) wordt onder andere op grond van de waarnemingen aan de mitosefiguren in oöcyten geconcludeerd, dat deze delingen als degeneratieve fragmentatie beschouwd moeten worden.

Newman (1913) vat de resultaten samen van het onderzoek, dat na het

overzichtsartikel van Bonnet (1899) was gepubliceerd. Hijzelf onderzocht de ovaria van het gordeldier. Op basis van zijn eigen waarnemingen concludeert hij, dat "a limited amount of parthenogenetic cleavage occurs, but that development proceeds no further than two or three cell divisions".

Na een analyse van spoelfiguren in oöcyten in atretische follikels van de muis kwam Kingery (1914) tot de conclusie, dat het geen delingsfiguren betreft, doch normale rijpingsfiguren. De "meercellige oöcyten", die men kan waarnemen, zijn ontstaan door degeneratieve fragmentatie, aldus Kingery, en niet door parthenogenetische delingen, want sommige cellen bevatten meerdere of abnormale kernen, terwijl de kernen bij andere cellen totaal ontbreken.

Clark (1923), die de ovaria van cavia's bestudeerde, kwam tot precies dezelfde conclusie. Ook Stockard & Papanicolaou (1917) waren van mening, dat er geen aanwijzingen voor ovarieële parthenogenese bij caviás zijn: "We failed to find anything to indicate a tendency toward parthenogenetic divisions in the many specimens we have examined, as Leo Loeb reported for these animals".

Sansom (1920) bestudeerde de delingen van oöcyten in atretische follikels in ovaria van de watermuis en vergeleek deze met delingsfiguren van bevruchte eicellen, die hij bij hetzelfde dier uit de tubae had geïsoleerd. Sansom "is geneigd" aan te nemen, dat er bij de oöcyten sprake is van een beperkte parthenogenetische ontwikkeling. Courrier (1923) en Courrier & Oberling (1923) beschreven echter onder andere een parthenogenetische blastocyst in een ovarium van een drie maanden oude cavia. Zij kwamen tot de volgende conclusie: "La parthénogénèse dans l'ovaire du cobaye est un fait incontestable. L'évolution parthénogénétique s'arrête en général après les premières segmentations de l'ovule, dans certains cas cependant elle peut se poursuivre et aboutir à la formation d'embryones".

Häggsström (1922) is veel minder expliciet. Hij vond slechts een beperkt aantal delingsstadia, echter nimmer in normale follikels en concludeerde, dat het voorbeelden van degeneratieve segmentatie waren en noemde het verschijnsel "a kind of parthenogenesis".

Engle (1927) bestudeerde de kwantitatieve aspecten van follikelatresie in 100 muize-ovaria, maar vond geen tekenen van parthenogenese. Lelièvre, Peyron & Corsy (1927) beschrijven onder andere de volgende waarnemingen aan een ovarium van een jonge cavia: "On observe dans l'ovaire, avec une fréquence variable suivant les mammifères envisagés, et qui est toujours plus grande pour les animaux jeunes, des phénomènes de division parthénogénétique des ovules. Il s'agit ordinairement de complexus comprenant de deux à huit cellules plus ou moins assimilables à des blastomères, mais difficiles à distinguer de la fragmentation ovulaire purement dégénérative liée à l'atrésie folliculaire". Uit deze zinsnede blijkt, dat de auteurs zich

wel bewust waren van het feit dat de waarnemingen voor tweeërlei uitleg vatbaar waren.

Branca (1925) bestudeerde totaal 500 rijpingsfiguren in ovaria van muizen, konijnen en cavia's. Hij nam geen tweede rijpingscdeling waar in atretische follikels en veronderstelde, dat rijpingsfiguren en de eerste mitotische deling vaak door andere auteurs door elkaar gehaald waren. Hij beschrijft delingen met en zonder voorafgaande vorming van een poollichaampje. Evenals Loeb (1932) beschrijft hij zelfs embryo – en placenta – vorming uit onbevuchte ovariële oöcyten. In acht onderzochte ovaria vond Loeb (1932) meerdere "embryonal placentomas" en "a young embryo proper".

Kampmeier (1929) is uiterst sceptisch ten aanzien van deze conclusies. Mede door zijn eigen werk met honde – ovaria is hij het er met Long en Evans (1922) en met Clark (1923) over eens, dat de zogenaamde klievingsstadia voor het merendeel degeneratieverschijnselen zijn en niet homoloog met klievingen van bevruchte eicellen. Hij laat de verschillende voor – en tegenstanders vanaf 1900 met hun argumenten de revue passeren en komt dan zelf tot de volgende conclusie: "The evidence offered thus far in favour of the occurrence in mammals of true parthenogenesis is extremely scanty." Ook maakt hij een indeling van zes typen "segmentations and cleavage – like conditions" en stelt, dat de meeste onderzoekers geen onderscheid gemaakt hebben tussen rijpings – en delingsfiguren. Tevens maakt Kampmeier als eerste duidelijk onderscheid tussen nog niet gerijpte en gerijpte oöcyten: "Cells resulting from the division of an immature oogonium and the "blastomeres" from that of a mature oocyte cannot be considered homologue, despite the fact that extrinsically they may be indistinguishable.

Ook Herman en Kirgis (1938) zijn van mening, dat de zogenaamde klievingsstadia degeneratieverschijnselen zijn. Hoewel zij vaak kern – en plasmadelingen vonden in degenererende follikels van cavia's, stelden zij tevens vast, dat deze ontwikkelingen nooit ver doorgingen, abnormaal waren en dat de "embryo's" tenslotte degenererden.

Door Saglik (1938) wordt een tweecellig ei in het ovarium van een gibbon beschreven zonder een conclusie ten aanzien van het optreden van parthenogenese of atresie.

Dempsey (1939) onderzocht cavia – ovaria, waarin ovulatie was geïnduceerd door het toedienen van LH. Hij constateerde in alle grote en middelgrote follikels het optreden van atresie en vond veel abnormale meiotische spoelfiguren. Zowel kernfragmentatie als het optreden van drie – of meerpolige mitosen werd waargenomen. Hoewel hij ook verschillende "klievingsstadia" waarnam, stelde hij vast, dat vele van deze stadia niet meer "levensvatbaar" waren en de oöcyten al geresorbeerd werden. Zijn conclusie luidde dan ook: "Regardless of whether this

mode of cleavage can be considered to be true parthenogenesis, the structures formed simulate to a remarkable degree the early developmental stages of fertilized eggs. In occasional eggs, the cleavage divisions may lead to the formation of quite complex structures and sometimes to a remarkable degree of early developmental stages of fertilized eggs."

Krafka (1939) nam veel klievingsstadia waar in ovaria van zoogdieren: "This phenomenon is so common among such mammals as the rat, mouse and guinea pig that at present we use sections of ovary for study of maturation in our course of embryology. In many of these slides atretic follicles are present which show definite cleavage stages, including the two cell stage, four cell stage, eight cell and some few more advanced stages".

Bacsich en Wyburn (1945) behandelen cavia's met geslachtshormonen (testosteronpropionaat en oestradiolmonobenzoaat) met de bedoeling het aantal atretische follikels en parthenogenetische ontwikkelingen te verhogen. Zij vonden echter geen verhoging van het percentage parthenogenese in de oöcyten van deze atretische follikels. In dit artikel is er echter geen sprake meer van een natuurlijke ontwikkeling. In de volgende decennia neemt het experimentele werk op dit gebied een grote vlucht, mede door het commerciële belang van de farmaceutische concerns in verband met de ontwikkelingen van orale anti - conceptiva. De vraag of de eerder beschreven waarnemingen nu parthenogenetische ontwikkelingen zijn of slechts degeneratieve verschijnselen, raakt op de achtergrond. De sterk toenemende kennis van de relatie tussen groei en rijping van de oöcyt en de follikel enerzijds en de ovariële cyclus anderzijds heeft een complex van factoren geïntroduceerd, die alle tezamen betrokken zouden moeten worden bij de vraagstelling in hoeverre men over parthenogenese kan spreken. Men kan niet volstaan met een beschrijving van een microscopisch beeld en conclusies trekken ten aanzien van parthenogenese zonder daarbij andere factoren te betrekken zoals bijvoorbeeld het moment in de ovariële cyclus waarop de waarnemingen werden gedaan, een analyse van de follikelvloeistof en de granulosa - cellen, DNA kleuringen, chromosoomstudies, enzovoort.

In de laatste jaren is er veel onderzoek verricht naar het voorkomen en de kenmerken van atresie. Het grote aantal publikaties op dit gebied is in diverse overzichtsartikelen samengevat, terwijl er tevens een bibliografie over dit onderwerp is samengesteld (Jones, 1970). Daaruit blijkt onder andere steeds duidelijker, dat atresie een complex gebeuren is binnen de follikel en als een normaal fysiologisch verouderingsproces geïnterpreteerd kan worden; derhalve niet onder het verschijnsel parthenogenese valt. Door de toegenomen kennis omtrent de rijping van de eicel en atresie is inmiddels wel duidelijk, dat in vele oudere artikelen het begrip parthenogenese ten onrechte gehanteerd is. De voornaamste oorzaken van deze verwarring zijn, dat men noch op de hoogte was van de rijpingsdelingen binnen de follikel noch van het stadium waarin de rijpe eicel zich bevindt vlak voor de

ovulatie of het begin van atresie. Vindt atresie plaats, dan fragmenteert de eicel soms in kleinere degenererende cytoplasmadelen. In deze situatie is het bijzonder is een verwarring met parthenogenese te verwachten vanwege de combinatie van cellen (fragmentatie) en een delingsfiguur (metafase II stadium van de rijpe eicel). Volgens Thibault (1949) is er alleen maar sprake van duidelijke ovariële parthenogenese in de artikelen van Courrier (1923) en Courrier & Oberling (1923).

Ondanks de toegenomen kennis van de eicelrijping en follikelgroei is het nog steeds niet eenvoudig een onderscheid te maken tussen atresie en parthenogenese, getuige onder andere een recent artikel van Czechowicz (1977) over histologisch ovarium – onderzoek bij de rat. De afnemende belangstelling gedurende de laatste decennia voor dit onderscheid ging echter gepaard met een toenemende belangstelling in de mogelijke rol van parthenogenese bij het ontstaan van ovariumtumoren. De vragen ten aanzien van dit onderwerp worden in de volgende paragraaf behandeld.

## II – 6.3 Teratomen

Teratomen worden door Fox (1980) als volgt gedefinieerd: "A teratoma represents a germ cell neoplasm which has differentiated along embryonic lines...." Beschrijvingen van teratomen bij zoogdieren zijn tot de zestiger jaren uiterst zeldzaam in de literatuur.

De teratologie omvatte oorspronkelijk alleen de beschrijvende anatomie van misvormde mensen en dieren. Volgens Smithells (1980) werd het begrip in 1832 voor het eerst gebruikt door Isidore Geoffroy Saint – Hilaire in de (zeer lange) titel van zijn driedelige uitgave met bijbehorende atlas: "Histoire générale et particulière des anomalies de l'organisation chez l'homme et les animaux, ouvrage comprenant des recherches sur les caractères, la classification, l'influence physiologique et pathologique, les rapport généraux, les lois et les causes des monstruosités, des variétés et vices de conformation ou traité de tératologie". Sedert de introductie van de term teratologie is dit begrip geleidelijk veel meer gaan omvatten dan de bovengenoemde omschrijving. Smithells (1980) geeft een opsomming van de vele mogelijkheden, die de teratologie de wetenschap kan bieden. In deze paragraaf worden de teratomen bij zoogdieren beschreven, waarbij uiteraard met name de aandacht gevestigd is op de rol, die parthenogenetische processen spelen in het ontstaan en in de ontwikkeling van teratomen. De teratomen bij de mens worden apart behandeld in de volgende paragraaf, II – 7.3, terwijl hierna bij de behandeling van de literatuur over zoogdier – teratologie de testisteratomen en ovariumteratomen apart worden behandeld.



## II – 6.3.1 Testisteratomen

Beschrijvingen van testisteratomen bij zoogdieren zijn, behalve bij het paard en de mens (II.7.3), zeer zeldzaam. Bij de muis wordt dit type tumor in 1954 voor het eerst beschreven door Stevens & Little (1954). Zij constateerden, dat er bij de mannetjes van een ingeteelde stam, de zogenaamde "129 stam", in 1% van de onderzochte dieren testisteratomen voorkwamen. Dit relatief hoge percentage maakte deze dieren zeer geschikt als proefdieren voor nader onderzoek naar het moment en de wijze, waarop deze tumoren ontstaan alsmede het moment, de volgorde en de wijze, waarop de weefseldifferentiatie in deze tumoren tot stand komt. Over al deze basale factoren was nog zeer weinig bekend behoudens het feit, dat de teratomen verschillende embryonale en volwassen weefsels bevatten die, normaal gesproken, niet in de testes voorkomen. Omdat Stevens & Little (1954) bij de vrouwtjes van deze stam geen ovariumteratomen aantroffen, concludeerden zij dan ook, dat de ontwikkeling van gonadeteratomen kennelijk afhankelijk is van geslachtsverschillen, hetgeen doet vermoeden, dat de etiologie van deze tumoren mede afhankelijk is van een verstoring in de hormoonbalans. Dit vermoeden werd versterkt door het feit, dat bij ongeveer 5% van de "129 – mannetjes" een testis (meestal de linker) degeneratieve verschijnselen en een beperkte grootte vertoonde, hetgeen eveneens verklaard werd door een hormonale invloed.

De "ontdekking" van deze zeer geschikte muizestam als proefdier voor verdere onderzoeken leidde tot een reeks van publikaties (Dunn & Stevens, 1970; Pierce, 1967; Pierce & Dixon, 1959 – A en B; Stevens 1958, 1959, 1962, 1964, 1967 – A en B, 1968, 1979 – A en B; Stevens & Hummel, 1957; Stevens & Mackensen, 1961). Deze publikaties bevatten met name resultaten van experimenteel werk, waarbij met behulp van transplanteer – experimenten gepoogd werd de ontstaanswijze van deze teratomen te ontrafelen.

Stevens (1958) en Pierce & Dixon (1959) veronderstelden – en Kleinsmith & Pierce (1964) bewezen – dat de teratoomweefsels ontstaan uit een pluripotente stamcel.

Stevens (1964) toonde aan, dat indien aanlegsels van genitalia getransplanteerd werden naar volwassen testes, de primordiale geslachtscellen zich tot teratomen konden ontwikkelen. Spontane en geïnduceerde testisteratomen ontstaan binnen de seminifere tubuli van foetale muizen. Dit betekent, dat teratomen ontstaan uit primordiale geslachtscellen of uit steuncellen (Stevens, 1962, 1967 – A). Muizen, die steriel zijn doordat zij als gevolg van een genetische afwijking geen primordiale geslachtscellen bezitten, ontwikkelen geen teratomen terwijl hun broertjes uit hetzelfde nest, die deze genetische afwijking niet hebben, ze wel ontwikkelen (Stevens, 1967 – B). Uit deze onderzoeksresultaten komen twee theorieën naar voren om het ontstaan van teratomen te verklaren (Stevens, 1970 – A).

– De eerste theorie gaat ervan uit, dat teratomen uit geslachtscellen ontstaan, waarschijnlijk door een parthenogenetische ontwikkeling, terwijl

– de tweede theorie veronderstelt, dat zij uit embryonale achtergebleven cellen ontstaan, die zich om de een of andere reden onttrokken hebben aan de invloed van de factoren, die verantwoordelijk zijn voor de embryonale organisatie.

Stevens (1970 – A) verenigde deze twee theorieën tot een enkele verklaring, waarbij hij onderscheid maakte tussen de geïnduceerde teratomen als gevolg van transplantaties van 1–6 dagen oude embryo's en spontane teratomen. Uit experimenten (Stevens, 1970 – A) bleek, dat de eerstgenoemde embryo's zich tot ongeorganiseerde clusters van ongedifferentieerde cellen ontwikkelen, die zich vervolgens verder ontwikkelen tot teratomen. Ook spontane teratomen ontwikkelen zich uit ongeorganiseerde clusters van ongedifferentieerde embryonale cellen, die nu echter uit de primordiale geslachtscellen ontstaan. Met andere woorden: de beide typen tumoren ontstaan uit ongedifferentieerde cellen, doch alleen de bron van deze cellen is verschillend, respectievelijk uit transplantaten van jonge embryo's en uit primordiale geslachtscellen. In 1973 werd een nieuw inteeltras (I29/terSv) met een hoge frequentie van congenitale testisteratomen door Stevens (1973) beschreven.

## II – 6.3.2 Ovariumteratomen

In 1974 publiceren Stevens & Varnum (1974) een zeer belangrijke waarneming inzake het voorkomen van ovariumteratomen bij muizen. Tot die tijd waren er slechts zes artikelen bekend, waarin dit type tumoren beschreven werd.

- Slye et al. (1920) vonden tussen 25.000 onderzochte muizen twee grote ovariumteratomen.
  - Jackson & Brues (1941) vonden een teratoom bij een C3H vrouwtje en constateerden, dat de samenstelling van deze tumor na herhaalde transplantaties gelijk bleef.
  - Fawcett (1950) beschreef een geval van tweezijdig voorkomende teratomen bij de ovaria van een Swiss albino vrouwtje.
  - Fekete & Ferrigno (1952) beschreven een ovariumteratoom bij een C3HeB vrouwtje.
  - Thiery (1963) vond bij twee C3H/N vrouwtjes, waarvan er één zwanger was, twee ovariumteratomen, terwijl
  - Meier et al. (1970) tenslotte eveneens twee teratomen aantroffen bij respectievelijk een CBA/7 en een DBA/27 vrouwtje.
- Dit overzicht illustreert duidelijk de grote zeldzaamheid van dit type tumoren bij muize – ovaria en de daaruit voortvloeiende grote beperkingen ten aanzien van experimenteel werk aan deze tumoren.

Deze belangrijke, limiterende faktor werd in een klap uitgewist toen Stevens & Varnum (1974) een inteeltras beschreven, waar bij ongeveer de helft van de vrouwtjes spontane ovariumteratomen worden gevormd. Deze ontdekking was

gebaseerd op een vondst van Dr. S.E. Bernstein, een collega van Stevens & Varnum en tevens werkzaam in het Jackson laboratorium te Bar Harbor, die in maart 1971 een ovariumteratoom vond bij een LT/ChReSv muis. Deze muis, en enige nauw verwante dieren werden Stevens & Varnum ter beschikking gesteld. Spoedig daarna werd geconstateerd, dat bij ongeveer de helft van de vrouwtjes – in het vervolg LT vrouwtjes genaamd – deze teratomen voorkwamen.

Stevens & Varnum (1974) beschreven daarna eveneens de samenstelling en de ontwikkeling van deze teratomen en toonden aan, dat zij langs parthenogenetische weg uit oöcyten ontstaan. Waargenomen werd, dat het percentage ovaria, waarin zich delende oöcyten bevonden, toenam van 0% bij 16 dagen oude dieren tot 100% bij 20 dagen oude vrouwtjes, terwijl het percentage dieren met teratomen toenam van nog 0% bij 1 maand oude dieren tot circa 50% bij dieren van 3 maanden. De delende oöcyten (in nog niet gerijpte follikels) werden als vroege stadia van teratoomontwikkeling geïnterpreteerd.

Deze interpretatie komt overeen met de conclusie van Mosinger (1961), die het ontstaan van teratomen bij cavia's becommentarieerde en concludeerde, dat zij ("embryomes") langs parthenogenetische weg ontstaan. Hij baseerde dit op het feit, dat hij alle stadia tussen het tweecellige – en het morulastadium waarnam in de buurt van de teratomen.

Evenals bij de vondst van het voorkomen van testisteratomen in de "129 stam" (Stevens & Little, 1954) heeft ook deze vondst, maar nu dus voor ovariumteratomen (Stevens & Varnum, 1974) een doorbraak in het experimentele werk tot gevolg.

Stevens (1975 – C) schreef een samenvatting over de stand van zaken ten aanzien van de teratocarcinogenese en embryogenese in de gonaden van mannetjes – en vrouwtjesmuizen. In datzelfde jaar werd het eerste grote congres gehouden over het onderzoek naar en aan teratocarcinomen, waarbij onder andere de twee grote pioniers op dit gebied, Stevens en Pierce, aanwezig waren en een belangrijke bijdrage leverden. Ook andere zeer bekende embryologen waren op dit congres aanwezig zoals Brinster, Mintz, Illmensee, Gearhart, Solter, Sherman, Graham en Iles. Ongetwijfeld is dit congres en de schriftelijke verslaglegging ervan (Sherman & Solter, 1975) mede een impuls geweest voor het vele onderzoek wat na 1975 op dit terrein verricht zal worden.

In 1977 rapporteren Eppig et al. (1977) een nieuw inteeltras, waarvan bijna alle vrouwtjes van 90 dagen en ouder bilaterale ovariumteratomen vertonen. Het betrof hier de zogenaamde LTXBJ lijn, die het resultaat was van een kruising van LT/Sv en C57BL/6J muizen. Gelukkigerwijs bleek het Gpi-1b allel op het glucosefosfaatisomerase (Gpi-1) locus in chromosoom 7 behouden te zijn in de nieuwe lijn. Omdat de LT/Sv lijn homozygoot is voor het Gpi-a allel op dit locus zijn de (LT/Sv x LTXBJ)FI hybriden heterozygoot op Gpi-1 en vertonen zij het

A, AB en B isoenzym in een verhouding 1:2:1. Elektroforese—studies van 23 teratomen van deze F1 vrouwtjes gaven in 21 gevallen een homozygoot A of B isoenzym banderingspatroon te zien, doch in twee gevallen een 1:2:1 heterozygoot banderingspatroon, hetgeen erop duidde dat zij heterozygoot Gpi — la/Gpi — lb waren.

Eppig et al. (1977) concludeerden uit deze resultaten, dat de teratomen, die in de (LT/Sv x LTXBJ)F1 vrouwtjes werden aangetroffen ontstaan waren uit parthenogenetisch gedeelde oöcyten, die de eerste meiotische deling voltooid hadden, waarbij de twee heterozygote patronen werden verklaard doordat crossing — over was opgetreden tussen het centromeer en het Gpi — 1 locus. Immers, indien de teratomen ontstaan uit oöcyten, die zich langs mitotische weg delen zonder eerst de meiose ondergaan te hebben, dan zouden alle teratomen het heterozygote banderingspatroon van de Gpi vertonen. Indien de eerste meiotische deling echter voor de parthenogenetische plaatsvindt, dan is te verwachten, dat de meeste teratomen homozygoot zijn en slechts een klein gedeelte heterozygoot als resultaat van een chromatide uitwisseling tussen het Gpi — 1 locus en het centromeer. Later wordt deze situatie als een model beschreven om de afstand tussen het centromeer en het locus te schatten (Eicher, 1978).

Naast dit onderzoek naar de ontstaanswijze van teratomen en de rol van de parthenogenese daarin zijn er ook nog verschillende andere typen onderzoek verricht aan deze teratomen. Volstaan wordt met een opsomming van enige typen onderzoek en een verwijzing naar de recente literatuur. Onderzoek is onder andere verricht naar het lot van teratocarcinoomcellen indien zij in blastocysten worden geïnjecteerd (Papaioannou et al., 1975; Mintz & Illmensee, 1975; Dewey, 1977; Papaioannou et al., 1978) dan wel gefuseerd worden met vroege muize — embryo's (Stewart, 1982) of indien zij als cellijnen verder gekweekt werden (Hogan, 1976; Nicolas et al., 1980).

Door Eppig (1978) werd gevonden, dat de frequentie van het voorkomen van ovariumteratomen gecorreleerd is met het gelijktijdig voorkomen van twee factoren: ten eerste de mogelijkheid van eicellen om een spontane parthenogenetische ontwikkeling te vertonen en ten tweede het veelvuldig voorkomen van follikels met weinig granulosa — cellen. Deze follikels worden GCD (Granulosa Cell Deficient) follikels genoemd.

Gupta & Hodgson (1981) en Stevens (1981) beschreven de genetische invloeden op het ontstaan en de ontwikkeling van teratocarcinomen, terwijl Lehman (1980) en Smithells (1980) overzichten gaven van de talloze potentiële mogelijkheden, die het onderzoek aan teratomen kan bieden.

Een van de mogelijkheden is het bestuderen van het inactivatieproces van X — chromosomen. Dit werd door Martin et al. (1978) verricht. Zij toonden aan, dat

in vitro gekweekte cellijnen van muize — teratomen het biochemische bewijs van X — chromosoom inaktivatie leveren indien zij onder omstandigheden groeien, waaronder het begin van een morfologische differentiatie mogelijk is. De literatuur over humane teratomen wordt behandeld in II — 7.3.

#### II — 6.4 Eicelveroudering of parthenogenese in het oviduct

Tijdens de ovulatie komen de gerijpte secundaire oöcyten (eicellen) met de omringende cumuluscellen en de follikelvloeistof vrij van het ovarium en worden via de tuba naar het oviduct getransporteerd. Hier vindt, normaal gesproken, de bevruchting plaats. Indien deze achter — wege blijft, degenereert de eicel. Dit is te zien aan onder andere het loslaten van de omringende cumulus — cellen, waardoor een "kale" eicel ontstaat; later kan men duidelijke cytoplasmatische degeneratieve verschijnselen waarnemen. Soms echter lijkt de geovuleerde oöcyt zich, zonder bevrucht te zijn, verder te ontwikkelen.

Hensen (1869) vond in een volledig van de uterus afgescheiden eileider van een konijn circa 100 eicellen, waarvan er meer dan 50 "in bestimmter Richtung gehende Entwicklungsstadien zeigten". De eileider was door een atrofie van de rechter uterushoorn enerzijds ontoegankelijk voor zaadcellen geworden, terwijl anderzijds de eicellen de eileider niet konden verlaten en daarin opgehoopt werden. De ontwikkelingsstadia bestonden uit verschillende aantallen "protoplasma afdelingen" met een of meer kernen. Hensen deed een aanbeveling om verder onderzoek te verrichten doordat deze toevallig aangetroffen situatie met een geringe chirurgische ingreep na te bootsen zou zijn en op deze wijze een model verkregen zou worden voor verdere studie naar algemene vragen over de ontwikkelingsmogelijkheden van eicellen en de resultaten van de ontwikkelingen. Tevens kan men op deze wijze ook voor mogelijke andere celkweken een goede "broedplaats" creëren, aldus Hensen.

Charlton (1917) constateerde, dat de veranderingen, welke in eicellen in het oviduct en in de uterus optraden, erg veel geleken op die, welke men in atretische follikels had waargenomen. Hij beschouwde deze veranderingen als degeneratieve verschijnselen, welke slechts een oppervlakkige overeenkomst met parthenogenetische ontwikkeling vertoonden: "The processes are considered degenerative and have only superficial resemblance to parthenogenetic development".

Mann (1924) onderzocht 252 eicellen, welke zich in totaal 50 ratte — oviducten bevonden. De oviducten waren afkomstig uit ratten, welke op verschillende tijdstippen na een post — partum ovulatie werden gedood, waardoor men eicellen van verschillende leeftijden verkreeg. In totaal werden 3 twee —, 1 drie — en 2

viercellige stadia gevonden. De eicellen, welke zich in het gedeelte bevonden, dat tegen de uterus aan ligt, waren bijna altijd gefragmenteerd of volledig gedegeneerd. De slotconclusie van Mann luidt: "There is no indication in the tubal rat material that normal cleavage ever occurs in these eggs although it may, of course, be possible that more material might include such stages since a few eggs give the appearance of approximately normal cleavage stages." Smith (1925) onderzocht de veranderingen bij circa 500 onbevuchte eieren uit de uterus van pseudo – zwangere gordeldieren. Van 289 eieren werden serie – coupes gemaakt. Een van de eerste tekenen van degeneratie is de vorm – verandering van het ei: van rond naar meer afgeplat. Na 1 – 2 dagen waren de eicellen halvemaaanvormig, waarna het cytoplasma geleidelijk fragmenteerde evenals de kern. Vaak viel de kern uiteen in een aantal fragmenten, die zich allen in een of meerdere cytoplasmatische delen verzamelden. In geen enkele eicel werden kernspoelen of andere mitosefiguren gevonden. Over haar interpretaties van deze waarnemingen laat Smith geen enkele twijfel bestaan: "It is thus seen that no observation made in this study can be interpreted as parthenogenetic development. All of the changes are regressive, degenerative!"

Tussen de honderden eicellen, welke na paring met een gevastomeerd mannetje uit konijne – tubae geïsoleerd en bestudeerd waren, vond Pincus (1930) in slechts drie gevallen enige ontwikkeling. In geen van deze gevallen was de ontwikkeling echter te vergelijken met de gelijkmatige klieving van bevruchte eieren.

Na de dertiger jaren is men algemeen overtuigd, dat er bij zoogdieren geen parthenogenese optreedt bij eicellen in de eileiders of de baarmoeder. We kunnen dan ook een verschuiving van het onderzoek waarnemen van aanvankelijk bestuderen van de natuurlijke veroudering in verband met het mogelijk optreden van parthenogenese naar meer anatomisch – fysiologisch gerichte studies inzake het geheel of gedeeltelijk afnemen van de mogelijkheden tot bevruchting van eicellen, al dan niet na een experimentele voorbehandeling van de dieren. Dit onderzoek valt echter buiten het onderwerp van dit proefschrift en zal hier niet worden weergegeven. Overzichtsartikelen over dit onderwerp zijn geschreven door Szollosi (1975) en Longo (1974 – A, 1974 – B, 1980), terwijl door Blandau (1975) een uitgebreide bibliografie is samengesteld.

## II – 6.5 Complete parthenogenese bij zoogdieren

Whitten (1971) vestigde de aandacht op afwijkende geslachtsverschillen bij enige inteeltstammen van muizen. Hij opperde de theoretische mogelijkheid, dat deze verschillen veroorzaakt zouden kunnen worden door het optreden van gynogenese als gevolg van een bevruchting door een morfologisch abnormale, genetisch inactieve, zaadcel. Bij BALB/ – cWt mannetjes is 30% van de zaadcellen

morfologisch abnormaal. Hemoglobine – onderzoek en onderzoek naar een iso – enzym, dat eveneens in de erythrocyten voorkomt, wees echter uit, dat er ten aanzien van deze twee factoren geen enkele homozygote nakomeling was tussen de 15 onderzochte vrouwtjes, die deel uitmaakten van 4 nesten, waarin tevens 9 mannetjes voorkwamen. Deze geslachtsverhouding (62,5% vrouwtjes) is typisch voor de onderzochte soort. Whitten concludeerde uit deze resultaten, dat "parthenotes from matings with BALB/cWt males occur rarely, if ever, and they are not responsible for the observed excess of females."

Stevens & Varnum (1974) namen waar, dat er bij vrouwtjes van de LT/Sv stam een relatief hoog percentage spontane parthenogenetische ontwikkelingen voorkwam bij eicellen in het oviduct en de uterus. Tevens werd implantatie in de uterus waargenomen, doch de meeste parthenogenonten stierven om onbekende redenen 5 – 7 dagen na het begin van de ontwikkeling. De parthenogenonten leken echter morfologisch identiek aan normale embryo's en waren afkomstig van oöcyten, waarin de eerste meiotische deling had plaats gevonden (Eppig et al., 1977). Nog steeds is niet bekend waarom deze parthenogenonten zo snel dood gaan hoewel er enige theoretische verklaringen mogelijk zijn (Petzholdt & Hoppe, 1980). In een poging om dit probleem op te lossen onderzochten Petzholdt & Hoppe (1980) de eiwitsynthese in bevruchte en onbevruchte eicellen en verschillende opeenvolgende stadia van normale en parthenogenetische jonge embryo's. Met behulp van tweedimensionale polyacrylamidegel – elektroforese werden de eiwitvlekken vergeleken wat betreft de relatieve positie, de aan – of afwezigheid en de dichtheid van de vlek. In het één – en tweecellig stadium werd een geringe achterstand in de eiwitsynthese van parthenogenonten waargenomen ten opzichte van de normaal bevruchte één – en tweecellige embryo's. In de latere ontwikkelingsstadia waren deze verschillen niet meer te detecteren zodat deze resultaten geen verklaring geven voor het doodgaan van de parthenogenonten tijdens of vlak na de implantatie. Opvallend is wel, dat de cellen in weefselkweek wel in leven blijven.

Stevens (1978) verkreeg verschillende volwassen chimereën uit LT/Sv parthenogenonten en normale embryo's van een andere stam, terwijl hij daarvoor (Stevens, 1975) parthenogenonten al jaren achtereen in leven had kunnen houden als teratoom. Deze experimenten toonden aan, dat cellen van LT/Sv parthenogenonten zich voorbij het, in de embryonale ontwikkeling, lethale stadium kunnen ontwikkelen.

Hoewel de eiwitsynthese dus vrijwel gelijk is in parthenogenonten en normale embryo's na het tweecellig stadium, vonden Petzholdt & Hoppe (1980), dat sommige eiwitten in verschillende hoeveelheden werden gesynthetiseerd en dat deze verschillen sterker en talrijker werden in het blastocyst – stadium. Hoewel deze verschillen in het gehele eiwitpatroon slechts van geringe omvang waren, achtten Petzholdt & Hoppe het mogelijk, dat zij enige "sleutel – eiwitten" omvatten, die nodig zijn voor de goede differentiatie tijdens en na de implantatie. Om hier een

nadere uitspraak over te kunnen doen, moet een verdere analyse van de verschillen worden uitgevoerd bij verder ontwikkelde stadia opdat nagegaan kan worden in hoeverre soortgelijke verschillen in de eiwitsynthese blijven bestaan. Bovendien is het aan te bevelen dit soort biochemische analyses te combineren met experimentele benaderingen zoals de isolatie van de trofoblast en de "inner cell mass" evenals de scheiding van de kiemlagen van de eicylinder om na te gaan in hoeverre bij differentiatie deze verschillen blijven bestaan. (Petzholdt & Hoppe, 1980).

## II - 6.6 Samenvatting en conclusies

In hoofdstuk II - 6 wordt de literatuur behandeld over natuurlijke niet - zygotenische wijzen van voortplanten bij zoogdieren. De literatuur over dit onderwerp bij de mens wordt apart behandeld in hoofdstuk II - 7.

De zoogdieren vormen de enige klasse der gewervelde dieren waarin geen volwassen (fertiele) nakomelingen zijn waargenomen die ontstaan zijn via een niet - zygotenisch voortplanting. Hoewel er reeds ruim een eeuw geleden delingen in oöcyten en eicellen zijn beschreven, dus binnen de follikel en in de eileiders, heeft het tot de jaren dertig geduurd alvorens men overeenstemming bereikte over de juiste interpretatie van deze waarnemingen. Men komt dan tot de conclusie dat de waarnemingen hoofdzakelijk vormen van atresie en eiceldegeneratie betroffen. Bovendien komen in die tijd nieuwe methoden beschikbaar om het onderscheid tussen celdelingen en celfragmentatie en/of degeneratie te bepalen: analyses van follikelvloeistof en de granulosa-cellen, DNA - bepalingen, chromosoomstudies en dergelijke. Gaandeweg verschuift de interesse dan ook van de bovengenoemde vraagstelling naar de bestudering van de relatie tussen de groei en de rijping van de oöcyt en die van de follikel enerzijds en de ovulatie en de bevruchtbaarheid van de eicel in relatie tot de ovariële cyclus anderzijds. Het is duidelijk dat het commerciële belang van de grote farmaceutische industrieën in verband met de ontwikkeling van anti - conceptiva hier een grote stimulans is geweest.

Een sterke opleving in de interesse naar mogelijke niet - zygotenische wijzen van voortplanten is in de laatste decennia waar te nemen. Reden hiervoor is het verband dat wordt gelegd tussen het ontstaan van testis - en ovariumteratomen en het optreden van zygotenische parthenogenese enerzijds en het ontdekken van bepaalde muizen - stammen met een hoog percentage spontane testis - en ovariumteratomen anderzijds. Uit de onderzoeksresultaten wordt in de jaren zeventig geconcludeerd dat deze teratomen ontstaan door zygotenische parthenogenetische ontwikkelingen.

Concluderend kan worden vastgesteld dat er geen zoogdieren zijn waargenomen die zich via een niet - zygotenische wijze voortplanten doch dat er wel parthenogenetische ontwikkelingen bij zoogdieren bekend zijn. Deze ontwikkelingen



resulteren echter niet in volwassen nakomelingen maar in teratomen. Slechts bij muizen is een op zygotenese lijkende parthenogenetische ontwikkeling beschreven. Deze parthenogenonten, die morfologisch identiek waren aan normale embryo's, stierven echter om onbekende redenen tussen de vijfde en de zevende dag van de ontwikkeling.

## HOOFDSTUK II – 7

### PARTHENOGENESE BIJ DE MENS

#### II – 7.1 Parthenogenese in de theologie

Het optreden van parthenogenese bij de mens is reeds in oude theologische geschriften beschreven:

”Daarom zal de Here zelf een teken geven: Zie, de jonkvrouw zal zwanger worden en een zoon baren; en zij zal hem den naam Immanuel geven.” (Jesaja 7, 14). Dit vers uit de bijbel is ongetwijfeld het meest bekende citaat over parthenogenese bij de mens. Er is echter sprake van een foutieve vertaling van het woord ”almah” dat een jonge vrouw betekent die echter niet per sé een maagd behoeft te zijn, aldus de Grouchy (1980). Ook de volgende verzen uit het evangelie naar Mattheüs en naar Lucas zijn vaak geïnterpreteerd als parthenogenese bij de mens:

”Zie, de maagd zal zwanger worden en een zoon baren, en men zal Hem den naam Immanuel geven, hetgeen betekent: God met ons. Toen Josef uit zijn slaap ontwaakt was, deed hij, zoals de engel des Heren hem bevolen had en nam zijn vrouw tot zich. En hij had geen gemeenschap met haar, voordat zij een zoon geboord had. En hij gaf hem den naam Jezus.” (Mattheüs 1, 23 – 25).

De aankondiging van Jezus’ geboorte in het evangelie naar Lucas:

”In de zesde maand nu werd de engel Gabriel van God gezonden naar een stad in Gallilea, genaamd Nazareth, tot een maagd, die ondertrouw was met een man, genaamd Josef, .....

En de engel zeide tot haar: Wees niet bevreesd, Maria; want gij hebt genade gevonden bij God. En zie, gij zult zwanger worden en een zoon baren, en gij zult Hem den naam Jezus geven. ....

En Maria zeide tot den engel: Hoe zal dat geschieden, daar ik geen omgang met een man heb? En de engel antwoordde en zeide tot haar: De heilige Geest zal over u komen en de kracht des Allerhoogsten zal u overschaduwen; daarom zal ook het heilige, dat verwekt wordt, Zoon Gods genoemd worden.” (Lucas 1, 26 – 35)

Götz (1931) publiceerde een overzichtsartikel over de antropologische en theologische beschouwingen inzake het ”Problem der jungfräulichen Mutterschaft”, hetgeen dus biologisch geïnterpreteerd neerkomt op het probleem van menselijke parthenogenese, aldus Götz.

## II – 7.2 Parthenogenese in ovariumfollikels.

Het eerste anatomisch gefundeerde onderzoek naar parthenogenese bij de mens is door Häggström (1922) verricht. Deze onderzocht de ovaria van een 22 – jarige vrouw. In beide ovaria vond hij totaal 11.988 atretische follikels waarvan er 2.921 een doorsnede van meer dan 100  $\mu$  hadden (101 – 1800  $\mu$ ). Van deze laatste groep werden in 767 follikels meer of minder duidelijke restanten van oöcyten gevonden. Veertien follikels werden uitvoerig door Häggström beschreven. Uit deze beschrijvingen blijkt dat Häggström gedegeneerde en gefragmenteerde oöcyten onderscheidde. Voorts "gedeelde" oöcyten met qua grootte zeer ongelijke "cellen", soms met en soms zonder een "kern". In vele "cellen" kwamen vacuolen in het cytoplasma voor, eveneens een teken van degeneratie.

Hoewel Häggström bevestigde dat de waargenomen delingen op het eerste gezicht de indruk wekken degeneratieve processen te zijn, is hij toch van mening dat deze interpretatie niet juist is getuige zijn conclusie:

"Dass es sich bei diesen Teilungsprozessen nichts desto weniger um eine Teilung auf parthenogenetischem Wege handeln kann, muss als sehr wahrscheinlich betrachtet werden ....."

Ook Krafka (1939) beschreef een gedeelde menselijke oöcyt. In een follikel van een ovarium van een zevenjarig meisje nam hij een oöcyt waar "that is definitely made up of four blastomeres". Evenals bij de waarnemingen van Häggström is hier echter geen sprake van parthenogenese omdat de blastomeren zo verschillend van grootte waren en omdat er geen duidelijke kernen werden waargenomen.

In een studie van meer dan 400 oöcyten en eicellen vond Shettles (1957) drie in vivo gedeelde oöcyten in vele gepuncteerde follikels met een diameter van 3 – 16 mm. Hij was van mening een 2 – cellig stadium met twee poollichaampjes, een 4 – cellig stadium met drie poollichaampjes en een blastocyst van ca. 50 cellen gevonden te hebben.

Omdat de drie "parthenogenonten" geen cumuluscellen meer rond de zona pellucida hadden is het waarschijnlijk dat zij uit atretische follikels afkomstig zijn. De waargenomen drie poollichaampjes zijn waarschijnlijk een foutieve interpretatie van drie cytoplasmatische uitlopers door de degenererende zona pellucida. Hierdoor lijkt er eerder sprake van fragmentatie te zijn dan van parthenogenese. Ook de foto van de "blastocyst" lijkt in het geheel niet en is een "schoolvoorbeeld van een gefragmenteerde oöcyt".

Dat een en ander weinig overtuigend is heeft Shettles zich waarschijnlijk ook gerealiseerd getuige zijn slotopmerking: "Continuing efforts are being made to record other intrafollicular developmental stages of the human ovum.

Ascertainment of the chromosomal constituency is planned for subsequent specimens”.

Het feit dat er later geen artikel van die strekking meer is verschenen versterkt alleen maar de twijfels rond de juistheid van Shettle's interpretaties.

### II – 7.3 Teratomen.

In paragraaf II – 6.3 is reeds een omschrijving van het begrip teratoom gegeven en is de literatuur over teratomen bij zoogdieren behandeld. Evenals in paragraaf II – 6.3 zal ook in deze paragraaf vooral de rol van de parthenogenese in de (humane) teratologie worden toegelicht. Gemakshalve wordt hier nogmaals het begrip teratoom omschreven: een teratoom is een tumor die niet alleen uit neoplastische cellen bestaat (zoals andere teratomen) maar ook uit vele gedifferentieerde cellen en weefsels die in meer of mindere mate volgroeid zijn. Een typische teratoom kan bijvoorbeeld zenuwcellen, spiercellen, bloedcellen, kliercellen en andere gespecialiseerde cellen bevatten. Deze cellen kunnen zich samenvoegen in spierbundels, klier- of hersenweefsel, kraakbeen of beenderen, terwijl in deze massa haren en tanden aangetroffen kunnen worden. Vroeger werd onderscheid gemaakt tussen massieve en cysteuze teratomen doch deze indeling bleek bij meer gedetailleerd histologisch onderzoek niet meer bruikbaar. Tegenwoordig onderscheidt men dan ook drie categorieën : onvolgroeide-, volgroeide- en monodermale teratomen. (Fox, 1980).

Voor een overzicht van definities en terminologie van teratomen wordt verwezen naar een artikel van Stevens & Pierce (1975). In deze paragraaf zal echter geen poging gedaan worden een overzicht van de literatuur over teratomen te geven. Dit zou enerzijds ver buiten de doelstelling van dit proefschrift gaan en anderzijds van uiterst beperkte waarde zijn gezien het bestaan van diverse goede overzichtsartikelen. Wel zal in het kort een historisch overzicht gegeven worden over de veronderstelde overeenkomst tussen het optreden van parthenogenese en het ontstaan van teratomen. Voor de recente ontwikkelingen wordt volstaan met een verwijzing naar overzichtsartikelen over teratomen onderscheiden naar de ontstaanswijze, (Saxen, 1976), de histologische classificatie, (Novis & Chorlton, 1974; Pierce, 1975; Scully, 1977; Fox, 1980; Nörgaard – Pedersen & Raghavan, 1980), de tumorkenmerken en klinische studies (Nörgaard – Pedersen & Raghavan, 1980; Yakushiji et al., 1981), de experimentele modellen (Stevens, 1976; Illmensee & Stevens, 1979; Nörgaard – Pedersen & Raghavan, 1980), ontwikkelings- en transplantatiestudies, (Stevens, 1970; Stevens & Varnum, 1974; Stevens, 1975 – A en B; Graham et al., 1975) en bibliografieën (Nörgaard – Pedersen & Raghavan, 1980; 175 referenties).

Recent onderzoek heeft aangetoond dat teratomen uit geslachtscellen ontstaan. Bij de vrouw (of bij vrouwelijke dieren) uit eicellen en bij de man (of mannelijke dieren) uit stamcellen van zaadcellen. (Illmensee & Stevens, 1979). Lang is er echter verschil van mening blijven bestaan over het ontstaan en de aard van teratomen hetgeen wordt geïllustreerd met het hierna volgende korte historische overzicht.

Waldeyer (1870) veronderstelde reeds, met enige vrees, een mogelijk verband tussen bepaalde vormen van ovariumtumoren en het optreden van ovariële parthenogenese: "Es ist nämlich sehr wohl annehmbar, dass die Epithelzellen des Ovariums, ihrer Bedeutung als unentwickelte Eizellen gemäss bei ihrer Vermehrung durch Teilung oder Sprossung andere, und zwar in der Richtung einer unvollständigen embryonalen Entwicklung weiter gehende Produkte liefern, als sie selbst sind. Man hat durchaus nicht nötig, für eine solche Weiterentwicklung weiblicher Keimzellen erst die Intercurrenz männlicher Zeugungsstoffe anzunehmen; die zahlreiche Beispiele parthenogenetischer Entwicklung, die sich von Tag zu Tag mehren, überheben uns in dieser Beziehung einer zu grossen Aengstlichkeit.....".

Ook andere auteurs waren later van mening dat teratomen ontstaan door parthenogenese van geslachtscellen uit het ovarium (Waldeyer, 1872), testis of ovotestis (Langhaus, 1887), rete (Adami, 1909), of de gang van Wolff (Cavazzani, 1907). Andere onderzoekers wijzen later deze ontstaanswijze echter van de hand (Nicholson, 1929; Kampmeyer, 1929; Krafska, 1936; Willis, 1953; Stevens, 1960). Ook Loeb (1911, 1912) wees op de betekenis van parthenogenese voor de verklaring van het ontstaan van teratomen en chorionepitheliomen. Hij was van mening dat deze pathologische groei zeer waarschijnlijk ontstond uit zich parthenogenetisch ontwikkelde oöcyten.

Hoch & Morlot (1920) verrichtten waarnemingen aan atretische follikels van ovaria van een twaalfjarig meisje en beschreven de "Parthenogenetische evolutie" van een oöcyt. Daarvoor had Broman (1911) reeds gepostuleerd dat de eerste rijpingsdeling van de humane oöcyt waarschijnlijk in het ovarium zou plaatsvinden. Toendertijd was er slechts weinig bekend over de follikelontwikkeling in menselijke ovaria en over de oögenese, getuige de opmerkingen van Broman: "Aber über den Bau des menschlichen Reifeeies wissen wir noch nichts.... en "Ueber den Verlauf des Furchungsprozesses speziell beim Menschen wissen wir noch gar nichts. Aller Wahrscheinlichkeit nach findet er aber in hauptsächlich derselben Weise statt, wie bei den anderen höheren Säugetieren".

Krafska (1936) vatte de toen bekende theoriën samen die opgesteld waren om het ontstaan van teratomen te verklaren. Een van deze vier theoriën is gebaseerd op het voorkomen van parthenogenese in geslachtscellen. Door migratie van vrijgekomen geslachtscellen door het lichaam werd het voorkomen van teratomen elders in het

lichaam verklaard. Krafka vond deze vier theoriën echter niet overtuigend en formuleerde een eigen theorie: "the organizer theory". Zijn theorie is een uitbreiding van Spemann's gelijkkluidende theorie uit de embryologie. Deze theorie is gebaseerd op experimenteel werk bij de salamander. Resultaten van dat werk toonden aan dat het mogelijk was een tweede ontwikkelingsas te induceren in bepaalde ontwikkelingsstadia. Voor deze ontwikkelingen worden "organisatoren" gepostuleerd. Zij worden niet in de eicellen gevormd maar ontwikkelen tijdens de groei en zijn verschillend in aantal en slechts tijdens een beperkte periode effectief.

Reiman & Miller (1939) beschreven een, naar hun idee, parthenogenetische ontwikkeling van een menselijke eicel na "aanprikken". Hoewel het hier beslist geen parthenogenese betrof, achten zij hun waarneming van groot belang: "The implications of this findings are many and varied. There are mentioned but two: its relation to dermoids, teratomas, etc., and its bearing on concepts of potency."

Sabrazes & Peyron (1940) beschreven bij een veertienjarige jongen metastases in de lymfeklieren. Het viel hen op dat zij qua structuur veel overeenkomst vertoonden met jonge stadia van zich ontwikkelende embryo's, met name de vorming van ecto -, meso - en entoderm en een amnionholte. De jongen was naar het ziekenhuis doorgestuurd in verband met een kwaadaardig gezwel aan een testikel. Een mogelijke verklaring voor de metastases in de lymfeklieren wordt als volgt omschreven: "Ces métastases ne sauraient s'expliquer par la migration d'éléments cellulaires isolés provenant d'un tissu déterminé; d'autre part, le le passage dans la circulation d'un module étiendu, déjà constitué d'éléments cellulaires divers, est peu vraisemblable. L'ensemble des dispositions morphologiques observées oblige donc a' envisager la migration d'un complexus polyvalent et indifférentié, tel que celui des boutons et cette hypothèse est précisément confirmée par nos observations."

Deze hypothese werd nader bevestigd in een serie artikelen (Peyron, 1940 - 1942) waarin gesproken werd over "parthénogenese polyembryonique" wanneer het testistumoren met verschillende typen weefsel betrof die histologisch gezien identiek waren met de normale embryonale ontwikkeling tot het moment waarop de somieten herkenbaar worden. Hetzelfde type testistumoren wordt in andere artikelen aangeduid als "la parthénogenèse tératologique du testicule chez l'homme" (Peyron, 1940 - B) en als "embryomes testiculaires d'origine parthénogénétique" (Peyron, 1940 - C). Ondanks deze diversiteit van benamingen berustte de naamgeving steeds op "de overeenkomsten van de intra - testiculaire parthenogenese met de normale embryonale ontwikkeling in de uterus. Ook bij ovaria werden door Peyron (1940 - D) parthenogenetische teratomen beschreven.

Later werden door andere onderzoekers eveneens "embryoid bodies" in teratomen van testis en ovaria van de mens beschreven (Friedman & Moore, 1946; Dixon & Moore, 1953; Melicow, 1955; Gaillard, 1955 - 1958; Masson, 1956; Simard, 1957; Cabanne, 1957 en Evans, 1957).

Willis (1954) vat de literatuur samen waarna hij tot de conclusie komt dat teratomen geen misvormde embryo's zijn die afgeleid zijn van losgeraakte blastomeren of ontstaan door parthenogenese, maar werkelijke neoplasmata die "ontsnapt" zijn aan de werking van primaire organisatoren. Het probleem van de ontstaanswijze van teratomen kwam opnieuw in de belangstelling toen het met behulp van een nieuw ontwikkelde techniek mogelijk werd om van celkernen het geslacht te bepalen aan de hand van de zogenaamde Barr - lichaampjes.

Hunter & Lennox (1954) onderzochten testikelteratomen op de aanwezigheid van het geslachtschromatine en vonden tot hun verbazing dat de helft van de teratomen de karakteristieke vrouwelijke chromatinekenmerken vertoonde. Deze waarnemingen werden door andere onderzoekers bevestigd en samengevat door Moore & Barr (1957), Ruge (1958), Ashley & Theiss (1958) en door Theid et al., (1960). Laatsgenoemden kwamen tot de conclusie dat menselijke teratomen kunnen ontstaan door parthenogenese, of door een neoplastische proliferatie van haploïde cellen die endomitose ondergaan hebben of door "zelfbevruchting waarbij twee haploïde cellen betrokken zijn". Twijfel over de juistheid van deze conclusie bleef echter bestaan doordat de betrouwbaarheid van de kerngeslachtsbepaling werd aangevochten, speciaal bij tumoren (Weinman et al., 1955; Meyers, 1959 en Taylor, 1963). Een meer betrouwbare methode is het onderzoek van metafase - chromosomen. Door Galton & Benirschke (1959) werd een eerste cytogenetisch onderzoek verricht aan een duidelijk gedifferentieerd teratoom van een 24 - jarige vrouw. Alle circa 100 bestudeerde metafases waren diploid ( $2n = 46$ ) en wezen op een normale vrouwelijke verdeling met twee X - chromosomen. Om een uitspraak te doen over de eerder genoemde vragen zijn ook cytogenetische gegevens van de man noodzakelijk.

Corfman & Richard (1964) onderzochten zes ovariumteratomen en namen waar dat de chromosoomaantallen en morfologie van de teratoomcellen binnen de normale limieten vielen en het vrouwelijke karyotype bezaten.

Theiss, Ashley & Mostofi (1960) vonden echter een andere geslachtsverhouding in teratomen van mannen: in 93 teratomen werden 64 mannelijke en 29 vrouwelijke karyotypen gevonden; een verhouding dus van 2:1.

Ook Dayan (1963) kwam tot deze verhouding: 22 mannelijke en 12 vrouwelijke karyotypen in 34 teratomen. Deze 2:1 verhouding komt overeen met de hypothese als zouden teratomen ontstaan door samensmelting van twee haploïde geslachtscellen. Immers de theoretische verdeling van de geslachtschromosomen in de aldus ontstane diploïde cellen zou zijn  $1-XX : 2-XY : 1-YY$ , aldus Corfman & Richard (1964). Wanneer men echter in beschouwing neemt dat de

YY-cellen niet levensvatbaar zijn dan wordt de theoretische verhouding 2-XY : 1-XX, dus 2-mannelijk : 1-vrouwelijk karyotype.

Linder (1969) onderzocht de vraag of ovariumteratomen ontstaan uit geslachtscellen die de meiose reeds hebben ondergaan. Deze teratomen zouden voor een deel genen moeten missen die wel in de somatische cellen van de betreffende persoon aanwezig zijn. Daartoe werden bij 11 teratomen met behulp van gel-elektroforese de produkten van drie onafhankelijk van elkaar segregerende iso-enzymallelen vergeleken met die van het normale weefsel. Uit het feit dat voor alle drie de kenmerken, waarvoor het normale weefsel heterozygoot was ongeveer de helft van de teratomen homozygoot was, concludeerde Linder dat deze resultaten de bovengenoemde hypothese bevestigen en teratomen dus afkomstig zijn van geslachtscellen die de meiose hebben ondergaan met verschillende maten van "crossing-over".

Met deze zelfde methode levert Linder later met Power (Linder & Power, 1970) verder bewijs voor de post-meiotische oorsprong van ovariumteratomen. In deze studie werden 39 teratomen van 33 patiënten onderzocht en werden vergelijkbare resultaten verkregen.

Enige jaren later wordt eveneens door Linder en medewerkers (Linder, McCaw & Hecht, 1975) de parthenogenetische oorsprong van goedaardige ovariumteratomen aangetoond met behulp van chromosoombandingpatronen in normaal en teratoomweefsel van vijf patiënten. Tevens werden wederom elektroforese-studies verricht. In alle vijf gevallen hadden zowel het normale als het teratoomweefsel het 46 XX karyotype. Er werden geen translokaties of andere afwijkingen waargenomen. De vijf normale weefsels bleken op 17 plaatsen in de chromosoomparen te verschillen in het banderingspatroon, terwijl de chromosoomparen in alle teratomen op die zelfde 17 plaatsen eenzelfde patroon vertoonden. De biochemische gegevens vertoonden een ander patroon: in zes gevallen waren de normale weefsels in elektroforetische zin heterozygoot terwijl de teratomen in drie van de zes gevallen homozygoot bleken te zijn. Deze gegevens komen overeen met de eerder genoemde resultaten, terwijl de honderd procent homologie in de banderingspatronen verklaard kan worden uit het feit dat het chromosoomlokatie betrof die zich allemaal op korte afstand van het centromeer bevonden en dus nagenoeg geen invloed ondervinden van "crossing-over". Deze cytologische en biochemische gegevens sluiten de mogelijkheid uit dat de teratomen ontstaan uit somatische cellen of uit een oögonium, een geslachtscel die nog niet met de meiose is begonnen.

Linder et al. (1975) concluderen dat deze goedaardige teratomen parthenogenetische tumoren zijn die ontstaan uit geslachtscellen die de eerste meiotische deling hebben ondergaan en de diploidie herstellen door de onderdrukking of de afsnoering van, of de fusie met, het tweede poollichaampje.



Deze conclusie werd later bevestigd door de resultaten van hetzelfde type onderzoek bij de muis (Eppig et al., 1977).

Nu de ontstaanswijze van ovariumteratomen bekend was geworden konden deze tumoren als goede modellen fungeren voor verder genetisch onderzoek. Zo onderzochten Ott et al. (1976 – A, 1976 – B) de plaats van het centromeer met behulp van teratoomgegevens en bestudeerden McCaw & Latt (1977) de replicatie van het X – chromosoom in deze parthenogenetische tumoren. Laatstgenoemden konden aantonen dat teratomen ook een laat replicerend X – chromosoom bezitten. Indien deze verlate replicatie de oorzaak is van X – inactivatie dan bevestigen deze waarnemingen dat X – inactivatie ook kan plaatsvinden zonder bevruchting. Ovariumteratomen blijken dus een andere ontstaanswijze te bezitten dan de, overigens veel minder vaak voorkomende, niet met gonaden verbonden teratomen. Deze ontstaan uit diploïde cellen via normale mitotische delingen, (Linder et al., 1975 – B; Hecht & McCaw, 1977 en Kaplan et al., 1979), en vallen derhalve buiten de context van dit literatuuroverzicht.

McCaw & Latt (1977) en Martin et al. (1978) gebruikten teratoomcellen als model voor de bestudering van het X – chromosoom(in)aktivatieproces. De meest aanvaarde theorie is dat de beide X – chromosomen genetisch actief blijven tot een bepaald moment in de ontwikkeling wanneer een X – chromosoom geïnactiveerd wordt waarna het niet meer als matrijs voor de synthese van m – RNA functioneert. McCaw & Latt gebruikten de cellen van vier humane ovariumtumoren als model voor een studie naar de vraag of de inactivatie van X – chromosomen uitsluitend plaats kan vinden na een bevruchting. Zij onderzochten daartoe de delingskinetiek van het X – chromosoom in individuele cellen van goedaardige ovariumtumoren van parthenogenetische oorsprong. Uit de resultaten bleek dat deze cellen een laat delend X – chromosoom bevatten. Indien de veronderstelling dat het later repliceren van het X – chromosoom een precieze indicatie is voor inactivatie van dit chromosoom (Lyon, 1961; 1972) dan bevestigen ook deze resultaten dat inactivatie van het X – chromosoom ook zonder bevruchting kan plaatsvinden.

Martin et al. (1978) werkten met cellijnen van muizeteratomen en concludeerden dat hun resultaten de hypothese bevestigen dat de differentiatie van de X – chromosomen gedurende de embryonale ontwikkeling de biochemische inactivatie van één van beide chromosomen betreft. Deze resultaten wijken af van die van McBurney & Adamson (1976) die met zowel biochemische alsmede met cytogenetische proeven aantoonde dat er slechts één van beide X – chromosomen actief blijkt te zijn in een cellijn van een vrouwelijk teratocarcinoom.

Een mogelijke verklaring van deze verschillen kan gezocht worden in het verschil in uitgangsmateriaal voor de cellijnen. McBurney & Adamson onderzochten cellen die geïsoleerd waren van een tumor van een embryo en afgeleid zouden kunnen zijn van een later, (post inactivatie), ontwikkelingsstadium dan de LT – cellen die

Martin et al. gebruikten. Een andere mogelijkheid is dat verschillen in isolatieprocedure en kweektechniek leiden tot verschillen in de genetische activiteit van de X – chromosomen.

Kaplan et al. (1979) onderzochten de chromosomen van teratomen buiten de gonaden bij twee vrouwen en vier mannen en constateerden dat deze teratomen ontstaan via mitoses van diploïde cellen. In mannen werden geen XX – tumoren gevonden. Dit zou men wel kunnen verwachten indien zij van parthenogenetische oorsprong waren.

Uit een tienjarig onderzoek aan 270 ovariumtumoren blijkt dat er een zeer grote variatie bestaat in de klinische verschijning en het gedrag van deze groep tumoren. (Bhattacharya et al., 1980). Uit de analyse blijkt circa 25% van de tumoren uit geslachtscellen te zijn ontstaan. In deze groep nemen de goedaardige cysteuze teratomen de belangrijkste plaats in: 47 van de 62.

Tot 1976 zijn er ongeveer 1363 gevallen van goedaardige cysteuze ovariumteratomen in de literatuur beschreven (Meyer, 1925; Kouchy, 1925; Smith, 1929; Blackwell et al., 1946; Quinland & St. Hill, 1947; Silverman & Alban, 1952; Marcial & Medina, 1958; Willis, 1967; Capuso et al., 1971 en Fox & Langley, 1976). Hoewel vast leek te staan dat de cysteuze ovariumteratomen langs parthenogenetische weg uit een oöcyt ontstaan waarin de eerste meiotische deling reeds heeft plaatsgevonden kwamen Omaha et al. (1980) na een cytogenetisch onderzoek aan 52 ovariumteratomen tot de conclusie dat deze teratomen soms ook uit oöcyten kunnen ontstaan waarin de eerste meiotische deling nog niet heeft plaatsgevonden. Er werden vier teratomen met chromosomale afwijkingen gevonden: 47 – XX + 12; 69 – XXX; 48 – XX + 14 + 21 en 47 – XX + 20. Bij deze laatste twee teratomen met chromosomale afwijkingen werden bovendien met behulp van Q – band kleuringen heteromorfe chromosomen aangetoond. Omaha et al. concludeerden tevens dat de afwijkende chromosoomconstituties wel eens van invloed zouden kunnen zijn op het karakter van de tumor.

Melniker & Slavutin (1980) beschreven een uniek goedaardig ovariumteratoom met twee ongewone kenmerken. Vijftien procent van de cellen bezat dubbele Barr – lichaampjes, en dus drie X – chromosomen, terwijl de tumor bovendien prostaatweefsel bevatte. Dit laatste is met name opvallend omdat verondersteld wordt dat weefseldifferentie in teratomen volgens hetzelfde patroon verloopt als bij foeten en de differentiatie in prostaatweefsel afhankelijk is van testosteron. In slechts twee gevallen van de 1363 goedaardige ovariumtumoren was reeds eerder prostaatweefsel gevonden zonder dat daar ooit een bevredigende verklaring voor is gegeven, aldus Melniker & Slavutin.

Teratomen met drie X – chromosomen moeten voor de eerste meiotische deling zijn ontstaan hoewel het voorkomen van twee Barr – lichaampjes ook verklaard kan

worden door polyploidie, aneuploidie, meiotic nondisjunction of mozaiekvorming. Om over deze mogelijkheden een nadere uitspraak te kunnen doen zijn karyotypebepaling of banderingsonderzoek absoluut noodzakelijk. Het is daarom zo jammer dat dit door Melniker & Slavutin niet gedaan is. Vast staat echter dat deze waarnemingen niet in strijd behoeven te zijn met de hypothese dat teratomen uit geslachtscellen ontstaan nadat deze de tweede meiotische deling hebben ondergaan. Dat er incidenteel ook andere genetische ontstaanswijzen mogelijk zijn moet echter niet uitgesloten worden geacht (Ohama et al., 1980).

Korte tijd geleden is door McCaw & Vyvial (1981) en door Hecht et al. (1981) voor het eerst gebruik gemaakt van humane parthenogenetische cellen voor onderzoek naar de genetische plaatsbepaling op het chromosoom van immuniteitsgenen, de zogenaamde groep HLA genen. Het is bekend dat deze groep genen op het zesde chromosoom gelokaliseerd zit, de afstand tot het centromeer was echter nog onbekend. In dit onderzoek werd geen recombinatie gevonden tussen de groep HLA genen en het centromeer hetgeen duidt op een plaats dicht bij het centromeer dan bij de uiteinden van het chromosoom.

#### II-7.4 Androgenese: de molazwangerschap (*Mola hydatidiformis*).

Recent is een speciale vorm van parthenogenese, de androgenese, in verband gebracht met een pathologische zwangerschap, de zogenaamde mola zwangerschap. De mola is een abnormale zwangerschap met sterk gezwollen chorion villi doch zonder embryo of amnionvlies (Vassilakos et al., 1977; Kajii & Ohama, 1977). Er is een grote geografische spreiding in het voorkomen van mola's gevonden. Zij komen veel vaker voor in de Aziatische en de Latijns - Amerikaanse landen dan in de Noord - Amerikaanse en Europese landen. (Joint project for study of Choriocarcinoma and Hydatiform Mole in Asia, 1959; Agüero et al., 1973). Aanvankelijk werd verondersteld dat het voorkomen van mola's toeneemt met de leeftijd van de moeder. (Benirschke & Driscoll, 1967).

Op basis van een cytogenetische en anatomische studie van 75 gevallen onderscheidde Vassilakos et al. (1977) gedeeltelijke en complete mola's. De gedeeltelijke mola's hadden chromosoom - afwijkingen en waren meestal triploïd, terwijl de complete mola's een normaal vrouwelijk karyotype bezaten (46,XX). De anatomische verschillen waren vooral in de villi gelokaliseerd terwijl eveneens gevonden werd dat de complete mola's nooit en de gedeeltelijke mola's altijd geassocieerd zijn met een navelstreng.

Szulman & Surti (1978 - A en B) bevestigden deze waarnemingen en voegden daar de volgende anatomische verschillen aan toe: de complete mola vertoont een voortschrijdende vloeïstofopname van de villi en een zwelling van de gehele

placenta, evenals een (sterke) "gross haphazardly distributed trophoblastic hyperplasia", het bevat geen embryo of foetus en het heeft een diploïd karyotype 46,XX. In een serie van elf mola's varieerde de leeftijd van de moeder van 17 tot 31 jaar, gemiddeld 23 jaar.

De incomplete mola is daarentegen triploïd, heeft een duidelijk waarneembare (levende of dode) foetus en vertoont een langzaam voortschrijdende zwelling. Het bezit een opvallend onvolledig gedifferentieerde trophoblast en er is een, zij het geringe, plaatselijke hyperplasie. In de serie van 11 incomplete mola's varieerde de leeftijd van de moeder van 18 tot 37 jaar, gemiddeld 25 jaar. De derde set chromosomen in deze triploïde mola's is eveneens van de vader afkomstig. In twee van de drie onderzochte gevallen bleek dat er sprake was van een dubbele bevruchting (dispermie) terwijl het derde geval een gevolg kon zijn van dispermie of van een falen van de eerste meiotische deling van de zaadcel. (Lawler et al., 1979)

Szulman & Surti (1978 – B) vonden tevens een afwijkende mola die niet in deze reeds genoemde verdeling van Vassilakos et al. kon worden ondergebracht. Het betrof een diploïde mola met ongewone morfologische kenmerken en een foetus. Zij vroegen zich derhalve af of deze mola mogelijk een derde soort vertegenwoordigde die tot dan toe nog onbekend was.

Ook Jacobs et al. (1980) vonden twee afwijkende mola's tussen 24 door hen op karyotype onderzochte mola's. Eén was type 46,XX maar met een normale van de moeder en van de vader afkomstige set chromosomen. Van de andere, type 46,XY, kon de oorsprong van de chromosomen niet bepaald worden. Twee jaar later werden door dezelfde groep nogmaals zes cytogenetisch afwijkende mola's beschreven waardoor duidelijk werd dat de onderverdeling in complete – en gedeeltelijke mola's niet voldoende is. Tot heden is er nog geen nieuwe, volledige klassificatie van alle mogelijke molatypen beschreven.

Wel is zeer recent door Szulman & Surti (1982) een meer gedetailleerde klinisch – pathologische omschrijving gegeven van de gedeeltelijke mola's op basis van een studie van 201 molazwangerschappen. De gedeeltelijke mola lijkt een mildere, wat afgezwakte vorm van de complete mola. Dit heeft met name betrekking op de placentamorfologie, het lot van het embryo en de hCG concentraties in het serum van de moeder. Er werden geen metastases gevonden die in verband stonden met gedeeltelijke mola's, evenmin chorionepitheliomen. In circa 50% van de mola – zwangerschappen verandert deze afwijking in een kwaadaardig chorionepitheliom waarbij de uitzonderlijke groei van de trophoblast het originele patroon van villi geheel kan doen verdwijnen (Edwards, 1982). Deze trofoblastwoekering groeit verder dan de normale begrenzing van het de uterus binnendringende trofoblastweefsel. Er kunnen, soms pas vele jaren nadat de mola is verwijderd, op ver van de uterus gelegen plaatsen, bijvoorbeeld in de longen, metastases worden gevormd (Edwards, 1982). Chorionepitheliomen gaan meestal gepaard met sterk verhoogde HCG – en prolactine – secretie. Deze hormonen

kunnen hyperstimulatie van de ovaria veroorzaken en cysten tot gevolg hebben. Bij alle patienten werden hoge concentraties HCG, FSH, LH en PRL gevonden (Gunasegaram et al., 1982).

Than et al. (1981) namen reeksen serummonsters van 41 patiënten met een trofoblast – tumor. Met behulp van radio – immunoassay werden onder andere de voor een zwangerschap specifieke eiwitten SP1 en PP5 bepaald. PP5 (placental protein 5) werd alleen bij die patiënten uit deze groep gevonden die een mola – zwangerschap bleken te hebben. Het eiwit was enige uren na verwijdering van de mola reeds uit het serum van de moeder verdwenen.

Eenzelfde onderzoek werd eveneens in 1981 door Lee et al. (1981) verricht. Lee en medewerkers kwamen tot de conclusie dat zowel de gemeten SP1 en de PP5 serumconcentraties een mogelijkheid bieden goedaardige en kwaadaardige trofoblast – tumoren van elkaar te onderscheiden.

Sinosich et al. (1982) beschreven een specifieke, zeer gevoelige radio – immunoassay voor het bepalen van het, eveneens met zwangerschap verband houdende eiwit, PPA (plasma protein A). Dit eiwit kon binnen 32 dagen na het begin van de zwangerschap worden aangetoond, bij tweelingen zelfs binnen 21 dagen. Het eiwit werd bovendien aangetoond in het serum van patienten met een mola – zwangerschap.

Szulman et al. (1982) analyseerden ongeveer 100 spontane, triploïde abortussen en vond dat 86% bestond uit gedeeltelijke mola's. Zowel bij de 14% niet – mola – zwangerschappen als de 86% mola – zwangerschappen stierven de foeten na ongeveer acht weken. De niet – mola – zwangerschappen aborteerden over het algemeen in het eerste trimester dikwijls met een nog levende of onlangs gestorven foet terwijl de mola's over het algemeen later aborteerden. Het is nog steeds niet duidelijk waardoor een triploïd embryo in zo'n hoog percentage tot mola wordt getransformeerd. Masuko & Tojo (1981) bestudeerden onder andere de celcyclus van normale trofoblastcellen en van de trofoblastcellen van mola's. Beide celtypen hadden een celcyclustijd van circa 15 uur maar de molacellen hadden een langere S – fase en een kortere G1 – fase.

Het is niet duidelijk waarom de 46,XX parthenogenonten de hydatidiforme veranderingen ondergaan (Edwards, 1982). De overerving van twee stel chromosomen van de vader zou een doodsoorzaak kunnen vormen door een immunologisch conflict tussen de antigenen van de parthenogenont en de immunorespons van de moeder. Er zijn pogingen gedaan om met behulp van immunotherapie de normale afstotingsreactie van de moeder tegen het trofoblastweefsel op te wekken maar dit heeft nog niet tot resultaat geleid. Deze afstotingsreactie zou mogelijk zijn op grond van het feit dat gebleken is dat de mola ontstaat door androgenese.

Zoals reeds eerder werd vermeld is het karyotype van de mola's meestal 46,XX

(Vassilakos et al., 1977; Szulman & Surti, 1978 – A en B). Er is een uniek geval bekend met een 48,XXYY karyotype (Shinohara et al., 1971) terwijl er zes 46,XY typen zijn beschreven (Sasaki et al., 1962; Shinohara et al., 1971; Bourgoïn et al., 1965; Surti & Szulman, 1979; Jacobs et al., 1980 en Ohama et al., 1981). Een cytogenetische studie naar het ontstaan van deze afwijking heeft aangetoond dat hoewel het chromosoombeeld kennelijk het normale vrouwelijke patroon vertoonde, het molaweefsel uitsluitend chromosomen van de vader bevat en dus van oorsprong androgetisch is (Kajii & Ohama, 1977). Deze eerste waarnemingen van Kajii & Ohama (1977) waren gebaseerd op banderingsstudies van chromosomen van molaweefsel, van de moeder en van de vader. Voor deze techniek gebruikten zij een speciale fluorescentie kleuringstechniek. Met behulp van deze zogenaamde Q – band techniek worden metafase – chromosomen gekleurd waarna zij specifieke karakteristieke banderingspatronen vertonen. Uit vergelijkende studies van deze patronen van de chromosomen van de mola en die van de beide ouders kan een uitspraak worden gedaan over de afkomst van de molachromosomen. In zeven gevallen waarin de twee groepen chromosomen van de vader verschillende banderingspatronen vertoonden waren de banderingspatronen van de twee groepen chromosomen van de mola steeds aan elkaar gelijk en identiek aan een van de groepen van de vader.

Later werden deze waarnemingen met dezelfde methode bevestigd door Wak et al., (1978) en Jacobs et al., (1978), terwijl Lawler et al., (1979) met behulp van enzymatische kenmerken eveneens tot bovengenoemde conclusie kwam. Androgetische parthenogenonten zijn echter gewoonlijk haploïd. De diploïdie van de mola's kan op drie wijzen zijn ontstaan: dubbele bevruchting, bevruchting door een diploïde zaadcel of bevruchting door een haploïde zaadcel gevolgd door een chromosoomverdubbeling van deze zaadcel in de eicel. Het feit dat 30 bestudeerde mola's homozygoot waren sluit de mogelijkheid van dubbele bevruchting uit (Kajii & Ohama, 1977). De twee andere mogelijke ontstaanswijzen zouden beide resulteren in een diploïde mola met XX of YY geslachtschromosomen. De YY molen worden waarschijnlijk niet gevonden omdat een cel tenminste één X chromosoom moet bevatten om te overleven. Het hoge percentage mola's dat een kwaadaardige ontwikkeling vertoont zou verklaard kunnen worden door een recessieve mutatie van een gen (of genen) dat de celgroei controleert. Omdat de homologe chromosomen in de mola genetisch identiek zijn, (behalve voor de uitgewisselde genen als gevolg van "crossing over"), zijn de mola's ook homozygoot voor de mutatie en kunnen zij op deze wijze buiten de normale groeiconrole vallen.

De ontstaanswijze van de zes reeds eerder genoemde 46,XY mola's is onlangs door Patillo et al., (1981) opgehelderd. Het karyotype 46,XY kan op drie manieren ontstaan:

- 1) door een normale bevruchting van een eicel door een 23,Y zaadcel.
- 2) door bevruchting van een eicel zonder chromosomen (of na inactivatie van de vrouwelijke pronucleus waarna de chromosomen

degenereren) door een zaadcel met karyotype 46,XY mogelijk door het geheel achterwege blijven van de eerste meiotische deling van die zaadcel.

3) door bevruchting van eenzelfde type eikel (als in 2) door twee zaadcellen met respectievelijk een 23,X en een 23,Y karyotype.

Kajii & Ohama (1977) veronderstelden dat de onder 2 genoemde ontstaanswijze het meest voor de hand zou liggen. Jacobs et al. (1980) konden geen onderscheid maken tussen de eerste en de derde mogelijkheid terwijl Surti et al. (1979) geen onderscheid tussen de tweede en de derde mogelijkheid konden maken. Patillo et al. (1981) concludeerden echter dat er in de door hen onderzochte mola sprake was van een dubbele bevruchting. Zij kwamen tot deze conclusie aan de hand van de resultaten van de Q-bandingstechniek. Hieruit bleek dat de chromosomen 3 en 22 van de mola niet van de moeder afkomstig waren hetgeen een normale bevruchting, mogelijkheid 1, uitsloot. De tweede mogelijkheid, onderdrukking van de meiotische deling van de zaadcel, kon ook worden uitgesloten doordat slechts een van de beide chromosomen 3 en 22 van de vader aan de mola waren doorgegeven. Dit gebeurt niet wanneer alle metafase-chromosomen in de eerste meiotische deling van de zaadcel bij elkaar blijven. Omaha et al. (1981) komen tot dezelfde conclusie na onderzoek van vier 46,XY mola's met behulp van de Q- en R-bandingstechnieken, HLA (histocompatibiliteits leukocyt-antigeen) specificaties en enzym-(fosfoglucomutase en esterase-D)-varianten. Ook Yamashita et al. (1979) kwamen tot een dergelijke conclusie na een onderzoek bij 13 complete mola's. Zij analyseerden de lymfocyten van het molaweefsel en van de beide ouders op de HLA-A en HLA-B kenmerken. Aangetoond werd dat het molaweefsel de homozygote A en B kenmerken had die identiek waren aan die van de vader en niet aan die van de moeder. Bovendien bleek het molaweefsel een homozygote expressie te bezitten van vaderlijke HLA-kenmerken waarvoor de vader zelf in 8 van de 9 gevallen heterozygoot was. Dit suggereert dat de mola's ontstaan waren uit een ei dat door een haploide zaadcel, die zijn chromosomen na de meiose had gedupliceerd, was bevrucht. Omaha et al. (1981) berekenen het percentage 46,XY mola's op 4% (5 van de 120 onderzochte molakaryotypen). Naar aanleiding van dit percentage veronderstellen Omaha en medewerkers dat waarschijnlijk 2% van de 46,XX mola's eveneens het resultaat is van dispermie. Immers, dispermie zou XX, XY en YY mola's tot gevolg hebben in een verhouding 1:2:1, waarbij de YY-mola's lethaal zijn.

Deze waarnemingen, die duiden op verschillende ontstaanswijzen van mola's met elk verschillende genetische gevolgen, zijn van belang bij het opstellen van een hypothese die de transformatie van complete mola's in kwaadaardige gezwellen zou kunnen verklaren.

Jacobs et al. (1982) publiceerden zeer recent de resultaten van vijf jaar cytogenetisch en epidemiologisch onderzoek naar complete en incomplete mola's. In een

populatie van 1602 onderzochte spontane abortussen werden op pathologische criteria, zoals die door Szulman & Surti (1978) waren omschreven, 40 complete en 88 incomplete mola's gevonden.

Cytogenetische waarnemingen bevestigden de reeds eerder (Vassilakos et al., 1977; Szulman & Surti, 1978 – A en B) vastgestelde karyotypische verschillen tussen complete en incomplete mola's, respectievelijk diploïd en triploïd. Nieuw was de positieve correlatie die gevonden werd tussen het percentage complete mola's en vrouwen beneden de 20 jaar en vrouwen die afkomstig waren van de Filippijnen. Deze twee effecten waren onafhankelijk van elkaar. In twee vroegere studies naar de epidemiologie van mola – zwangerschappen, eveneens uitgevoerd op Hawaï, was aangetoond dat Japanse vrouwen een verhoogd risico hadden, (McCourriston, 1968; Natoli & Rashad, 1972). Beide studies omvatten echter geen Filippijnse vrouwen. Jacobs en medewerkers verklaren deze verschillen doordat in die twee onderzoeken geen onderscheid werd gemaakt tussen complete en incomplete mola's terwijl er eveneens gestandaardiseerde criteria ontbraken voor de selectie van mola – zwangerschappen. Op grond van de beschikbare gegevens concluderen Jacobs en medewerkers dat alle klassieke complete mola's androgenonten zijn en dat bijna alle incomplete mola's triploïd zijn.

De opmerkelijke verschillen in de twee eindprodukten van ovariumteratomen en mola's roepen diverse vragen op over de mogelijke fysiologische verschillen tussen het uitsluitend van de vader of van de moeder afkomstige genetische materiaal en het eicelcytoplasma. Ook de studie naar de invloed van de plaats van de implantatie en de interactie tussen de moeder en de mola zijn mogelijk van belang om de verschillen tussen mola's en teratomen te verklaren. Zeer interessant zou het zijn indien het mogelijk was een gynogenetische ontwikkeling in de uterus te bestuderen en deze te vergelijken met de mola – zwangerschap.

## II – 7.5 Complete parthenogenese bij de mens ?

Een van de eerste theoretische artikelen over complete parthenogenese bij de mens is door Delage (1913) geschreven. Delage paste de resultaten van experimentele parthenogenese toe om gevallen van unilaterale erfelijkheid te verklaren in verband met nakomelingen van middelzware drinkers en zwaar verslaafde alcoholisten. Uitgaande van het feit dat alcohol chromatine in de zaadcellen beschadigt zouden in navolging van de stralingsexperimenten van O. Hertwig, bij landurig zwaar alcoholgebruik gezonde nakomelingen ontstaan door gynogenese. Bij middelzwaar gebruik daarentegen abnormale nakomelingen doordat het chromatine in de zaadcel nog niet in die mate is beschadigt dat het totaal geen genetische bijdrage meer kan leveren. De Nederlander Benders (1914) meende een bevestiging van deze theorie gezien te hebben bij enige patiënten in zijn kliniek te Meerenberg. Het betrof



hier nakomelingen van een vader "die in het eerste jaar van zijn huwelijk ging drinken en wel zóó hevig, dat hij in korten tijd zijn vrij groote bezittingen er doorgebracht had en in ongeveer tien jaren tijds zich had "doodgedronken".

Als vervolg op een lezing van Spurway (1955) publiceerde een Engels weekblad, de "Sunday Pictorial", een oproep aan moeders die ervan overtuigd waren dat zij een kind gekregen hadden zonder dat gemeenschap met een man had plaats gevonden. Negentien moeders gaven gehoor aan deze oproep. Daarna werd het Charing Cross Hospital in Londen benaderd met het verzoek deze negentien aanspraken op parthenogenese wetenschappelijk op hun juistheid te toetsen. Elf gevallen vielen reeds na een eerste interview af, omdat betrokkenen van mening waren dat "virgin birth" een geboorte inhield die een gevolg was van een geslachtsgemeenschap waarbij het maagdenvlies intact was gebleven. Bij de resterende acht moeders en dochters werden bloedgroepstudies gedaan. Op grond hiervan, en naar aanleiding van de kleuren van de ogen, bleef er nog één paar over wat nog steeds niet uitgesloten kon worden: Mrs. Alpha and daughter". Moeder en dochter bezaten beide de mogelijkheid om phenylthiocarbamide te proeven (beiden konden deze stof proeven tot een drempelwaarde van 2,54 mg per liter). Ook het elektroforesepatroon van het bloedserum en een chemisch speekselonderzoek gaven geen onderscheid tussen moeder en dochter te zien. Tenslotte werden huidtransplantaties verricht. Het transplantaat van de dochter op de moeder werd na circa vier weken afgestoten, terwijl de reciproke transplantatie er zes weken "gezond" uitzag alvorens zij tekenen van devascularisatie vertoonde. Merkwaardig genoeg concludeerde Balfour - Lynn (1956) dat het belang van deze huidtransplantatie studie nogal duister is. De slotconclusie van het artikel luidt dan ook: "In such a case as this, rigorous proof is impossible, but it remains that all the evidence obtained from serological and special tests is consistent with what would be expected in a case of parthenogenesis. The absence of the pre - knowledge factor although not capable of precise statistical evaluation, adds greatly to the probability of such a claim being well founded. Thus, this mother's claim must not only be considered seriously, but it must also be admitted that we have been unable to disprove it".

Op grond van de huidige kennis over afstotingsmechanismen moeten we aannemen dat er ook bij het laatste moeder - dochter paar geen sprake is geweest van parthenogenese zodat er in geen enkel geval sprake is geweest van de door de moeders geclaimde parthenogenetische ontstaanswijze van hun dochters. Platt & Stratton (1956) kwamen in een andere studie tot dezelfde conclusie. Zij onderzochten de hypothese dat vrouwen die geen ovariumweefsel bezitten en tijdens de puberteit geen secundaire geslachtskenmerken gaan vertonen mogelijk door parthenogenese ontstaan zouden zijn. In navolging van Spurway (1955) werd met behulp van bloedgroepstudies aangetoond dat dit niet het geval was.

## II-7.6 Samenvatting en conclusies

In hoofdstuk II-7 wordt de literatuur beschreven waarin sprake is van niet-zygotenetische ontwikkelingen bij de mens.

Evenals bij de zoogdieren (zie II-6) zijn er ook bij de mens waarnemingen gedaan aan oöcyten en eicellen die delingskarakteristieken vertoonden en waarvan men zich afvroeg of er sprake was van parthenogenetische ontwikkelingen. Hoewel dat bij een aantal publikaties ten onrechte als zodanig werd geïnterpreteerd zijn er in de laatste tien jaar opzienbarende nieuwe ontwikkelingen beschreven waarin er wel degelijk sprake is van zygotenetische ontwikkelingen.

In dit verband wordt gewezen op het voorkomen van teratomen bij de mens. Recent onderzoek heeft aangetoond dat een gedeelte van deze teratomen uit geslachtsellen ontstaan. Na een kort historisch overzicht van publicaties waarin het verband tussen testis- en ovariumtumoren en parthenogenese wordt beschreven, wordt met name de literatuur over dit onderwerp van de laatste 10 tot 15 jaar behandeld. Het blijkt dat er een zeer grote variatie bestaat in de klinische verschijning en het gedrag van ovariumtumoren. Uit een analyse is gebleken dat 25% van deze tumoren uit geslachtsellen ontstaat. Het betreft hier met name de goedaardige cysteuze teratomen. Soms ontstaan zij uit oöcyten waarin de eerste meiotische deling nog niet plaatsgevonden heeft, soms is dat echter wel het geval. Uit cytogenetisch onderzoek, waarbij met name chromosombandingen werden onderzocht, is gebleken dat er in een aantal gevallen chromosomale afwijkingen in de teratomen voorkwamen. Er zijn aanwijzingen gevonden dat deze afwijkingen van invloed zouden kunnen zijn op het karakter van de tumor.

Pas enige jaren geleden is er een verband gelegd tussen het optreden van zygotenetische ontwikkelingen en het voorkomen van een pathologische zwangerschap, de zogenaamde mola zwangerschap. Op basis van cytogenetische en anatomische verschillen worden twee typen mola's onderscheiden: gedeeltelijke en complete mola's. De gedeeltelijke mola's zijn triploid, hebben chromosoomafwijkingen en bezitten een duidelijk waarneembare (levende of dode) foetus. De complete mola's bezitten geen embryo of foetus en hebben het normale vrouwelijke karyotype. Wel bleek uit de resultaten van banderingsstudies van de chromosomen van de moeder, de vader en de mola, dat alle chromosomen van de vader afkomstig zijn; er is dus sprake van een androgenetische zygotenetische ontwikkeling. Hoewel de overerving van twee stel chromosomen, als gevolg van dispermie of bevruchting door een zaadcel waarin de eerste meiotische deling achterwege is gebleven, een doodsoorzaak zou kunnen vormen door een immunologisch conflict tussen de antigenen van de zygotenetenont en de immunorespons van de moeder, is nog steeds niet duidelijk waarom de 46,XX zygotenetenonten de transformatie tot mola ondergaan.

Zeer recent is aangetoond dat men goedaardige en kwaadaardige trofoblast – tumoren van elkaar kan onderscheiden door concentratie – bepalingen met behulp van radio – immuno – assay van serummonsters van bepaalde, voor een zwangerschap specifieke eiwitten.

Recent zijn ook mola's met andere karyotypen gevonden, onder andere enige met 46,XY en één 48,XXYY karyotype. Waarschijnlijk zal binnenkort dan ook de huidige verdeling in gedeeltelijke en complete mola's uitgebreid moeten worden met tenminste een derde categorie 46,XY mola's en een vierde categorie met aneuploïde mola's.

Evenals bij de zoogdieren (II – 6.6) kan ten aanzien van de mens geconcludeerd worden dat er geen levende, niet – zygotenetische individuen bekend zijn. Wel zijn er parthenogenetische en zygotenetische ontwikkelingen (teratomen en mola's) beschreven. Het betreft hier echter pathologische ontwikkelingen die niet tot de vorming van op normale embryo's gelijkende individuen leiden. Hoewel er, met name de laatste jaren, veel bekend geworden is over de ontstaanswijze en de cytogenetische aspecten van deze ontwikkelingen is nog geheel onbekend wat de oorzaak is van het ontstaan en waardoor de ontwikkeling een pathologisch karakter krijgt.

## HOOFDSTUK II – 8

### BIBLIOGRAFIE

De afkortingen van de tijdschrifttitels in deze bibliografie zijn in overeenstemming met de "International Standard ISO – 4 – 1972: Documentation – International code for the abbreviation of titles of periodicals (ISO Standards Handbook I, 1977). Om deze internationale standaard effectief toe te kunnen passen werden de internationale lijsten van afkortingen voor woorden uit tijdschrifttitels geraadpleegd. Deze afkortingen staan vermeld in ISO 833 – 1974.

Bovengenoemde internationale standaards' worden sedert 1982 ook door de National Library of Medicine (USA) gevolgd en zijn derhalve vanaf 1982 verwerkt in de Index Medicus. Voor die tijd werden de afkortingen geformuleerd volgens de regels van de American National Standard for the abbreviation of titles of periodicals.

- ABBOTT, U.K., and YEE, G.W. (1976) Avian Genetics.  
In: R.C. King (Ed), Handbook of Genetics, Vol. 4: Vertebrates of Genetic Interest, 151 – 200. Plenum Publ. Corp., N.Y. – London.
- ABDEL – HAMEED, F. and SHOFFNER, R.N. Intersexes and Sex determination in chickens  
*Science*, 172, 962 – 964.
- ABRAMOFF, P., DARNELL, R.M. and BALSANO, J.S. (1968) Electrophoretic demonstration of the hybrid origin of the gynogenetic teleost *Poecilia formosa*  
*Am. Nat.*, 102, 555 – 558.
- ADAMI, J.G. (1909) A Textbook of Pathology.  
Philadelphia, Lea & Febiger.
- AGNERO, O., KIZER, S. and PINEDO, G. (1973)  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 116, 1117 – 1120.
- D'ANCONA, U. (1945) Sexual differentiation of the gonad and the sexualization of the germ cells in teleosts.  
*Nature*, 156, 603 – 604.

- ANGUS, R.A., and SCHULTZ, R.J. (1979) Clonal diversity in the unisexual fish *Poeciliopsis - monacha - lucida*, a tissue graft analysis. *Evolution*, 33, (1 part 1), 27 - 40.
- ANGUS, R.A., and Schultz, R.J. (1980) Meristic variation in homozygous and heterozygous fish.  
In: The University of British Columbia, Second International Congress of systematic and evolutionary biology, Vancouver, B.C., Canada, July 17 - 24, 1980, 129.
- ANKEL, W.E. (1927) Neuere Arbeiten zur Zytologie der natürlichen Parthenogenese der Tiere.  
*Z. indukt. Abstammungs - Vererbungsl.*, 45, 232 - 278.
- ANKEL, W.E. (1929) Neuere Arbeiten zur Zytologie der natürlichen Parthenogenese der Tiere.  
*Z. indukt. Abstammungs - Vererbungsl.*, 52, 318 - 370.
- ARISTOTELES (1837) *Traité de la Génération des Animeaux.*  
Traduction française par J. Barthélemy - Saint - Hilaire, 2 vol., Paris.
- ASHER, J.H. (1970 - A) Parthenogenesis and Genetic variability.  
Ph.D. thesis, Univ. of Michigan, 227 p.
- ASHER, J.H. (1970 - B) The genetics of parthenogenetic populations.  
*Genetics*, 64, S2 (abstr.).
- ASHER, J.H. (1970 - C) Parthenogenesis and genetic variability. II. One - locus models for various diploid populations.  
*Genetics*, 66, 369 - 391.
- ASHER, J.H. (1971) Parthenogenesis and Genetic variability.  
*Diss. Abstr. Int.*, 31, 7681 - B.
- ASHER, J.H. and NACE, G.W. (1971) The genetic structure and evolutionary fate of parthenogenetic amphibian populations as determined by Markovian analysis.  
*Am. Zool.*, 11, 381 - 398.
- ASHLEY, D.J. (1959) Are ovarian pregnancies parthenogenetic?  
*Am. J. Hum. Genet.*, 11, 305 - 310.
- ASHLEY, D.J.B., and THEISS, E.A. (1958) Nuclear sex of patients with testicular tumors.  
*Science*, 128, 1434 - 1435.

- ASTAUROV, B.L. (1971) Parthenogenesis and polyploidy in the evolution of animals.  
*Priroda*, (Mosk.), 6, 20 – 28.
- ASTAUROV, B.L. and DEMIN, Yu. S. (1972) Parthenogenesis in birds.  
*Sov. J. Dev. Biol.*, 3, 95 – 111 (Engl. transl. from *Ontogenez*, 3, 123 – 143).
- ATHIAS. (1936)  
*Bull. Assoc. Fr. Cancer*, 16, 711.
- AXTELL, R.W. (1966) Geographical distribution of the unisexual whiptail *Cnemidophorus neomexicanus* (Sauria : Teiidae) – present and past.  
*Herpetologica*, 22, 241 – 253.
- BAIN, A.D., and SCOTT, J.S. (1965) Mixed gonadal dysgenesis with XX/XY mosaicism: the evidence for the occurrence of fertilization by two spermatozoa in man.  
*Lancet*, 1965 I, 1035 – 1039.
- BALSANO, J.S., DARNELL, R.M. and ABRAMOFF, P. (1972) Electrophoretic evidence of triploidy associated with populations of the gynogenetic teleost, *Poecilia formosa*.  
*Copeia*, 1972, 292 – 302.
- BALSANO, J.S., KUCHARSKI, K., RANDLE, E.J., RASCH, E.M. and MONACO, P.J. (1981) Reproduction of competition between bi – sexual and uni – sexual females of *Poecilia* in Northeastern Mexico.  
In: D.L.G. Noakes and J.A. Ward, (Eds), *Developments in environmental biology of fishes*, vol. 1, 39 – 48. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- BALTZER, F. (1922) Ueber die Herstellung und Aufzucht eines haploiden *Triton taleniatu*s.  
*Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges.*, 103, Bern, 248 – 249.
- BARFURTH, D. (1896) Versuche über die parthenogenetische Forschung des Hühnereies.  
*Arch. Entwicklun*gsmech. Org. (Wilhelm Roux), 2, 203 – 351.
- BARTELMEZ, G.W. and RIDDLE, O. (1924) On parthenogenetic cleavage and on the role of water absorption by the ovum in the formation of subgerminal cavity in the pigeon's egg.  
*Am. J. Anat.*, 33, 57 – 66.

- BASRUR, P.K. (1974) Cytogenetics of avian reproduction.  
In: Hafez, E.S.E. (Ed), Reproduction in farm animals, 3rd ed., Chapter 17,  
339 – 347. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA.
- BATAILLON, E. (1900) La segmentation parthénogénétique expérimentelle chez  
les Amphibiens et les Poissons.  
*C.R. Acad. Sci. Paris*, Juillet 1900.
- BATAILLON, E. and TCHOU – SU (1929) Analyse de la fécon dation chez les  
Batraciens par l'hybridation et la polyspermie physiologique.  
*Roux' Arch.*, 115, 779 – 824.
- BATTAGLIA, E. (1951) Development of angiosperm embryo sacs with  
non – haploid eggs.  
*Am. J. Bot.*, 38, 718 – 724.
- BEATTY, R.A. (1957) Parthenogenesis and polyploidy in mammalian  
development.  
*Cambridge Monogr. in Exp. Biol.*, 7, 132 p. Cambridge University Press,  
New York.
- BEATTY, R.A. (1967) Parthenogenesis in vertebrates.  
In: C.B. Metz & A. Monroy (Eds), Fertilization, comparative morphology,  
biochemistry, and immunology, Vol. 1, 413 – 440, Academic Press, New  
York.
- BEATTY, R.A. (1970) Parthenogenesis and heteroploidy in the mammalian egg.  
In: J.D. Biggers and A.W. Schulltz (Eds), Oogenesis, proceedings of a  
symposium, Baltimore, Maryland, October 1970. University Park Press,  
Baltimore – London.
- BELLONCI, G. (1885) Intorno Al modo die Genesi di un Globulo Polare Nell'  
Ovulo Ovarico di Alcuni Mammiferi.  
Bologna, 1885.
- BENDERS, A.M. (1914) Parthenogenesis bij den Mensch".  
*Ned. Tijdsch. Geneesk.*, 1914, I, 880 – 882.
- BENIRSCHKE, K. and DRISCOLL, S.G. (1967) Hydatidiform mole.  
In: Handbuch der Speziellen pathologischen Anatomie und Histologie; teil  
VII/5, The Pathology in the Human Placenta, 348 – 380. Springer Verlag,  
Berlin.

- BENIRSCHKE, K. (1980) Needs for animal models of human diseases of the reproductive system.  
*Am. J. Pathol.* 101, (3 suppl) S229 – S239.
- BERGER, L. (1964) Is *Rana esculenta lessonae* Camerano a distinct species?  
*Ann. Zool. Warszawa*, 22, 45 – 61.
- BERGER, L. (1966) Biometrical studies on the population of green frogs from the environs of Poznań.  
*Ann. Zool. (Warszawa)*, 23(11), 303 – 324.
- BERGER, L. (1967) Embryonal and larval development of F1 generation of green frogs different combinations.  
*Acta Zool. Cracov.*, 12(7), 123 – 160.
- BERGER, L. (1968) Morphology of the FI(1) generation of various crosses within *Rana esculenta* – complex.  
*Acta Zool. Cracov.*, 13, 301 – 324.
- BERGER, L. (1970) Some characteristics of the crosses within *Rana esculenta* complex in post – larval development.  
*Ann. Zool. Warszawa*, 27, 373 – 416.
- BERGER, L. (1971) Viability, sex and morphology of F2 generation within forms of *Rana esculenta* – complex.  
*Zool. Pol.*, 21, 345 – 393.
- BERGER, L. (1973) Systematics and hybridization in European green frogs of *Rana esculenta* complex.  
*J. Herpetol.*, 7, 1 – 10.
- BEZY, R.L. (1972) Karyotypic variation and evolution of the lizards in the family *Xantusiidae*.  
*Contrib. Sci. Nat. Hist. Mus. Los Angeles Cty*, 227, 1 – 29.
- BICKHAM, J.W., MCKINNEY, C.O., and MATHEWS, M.F. (1976) Karyotypes of the parthenogenetic whiptail lizard *Cnemidophorus laredoensis* and its presumed parental species.  
( *Sauria:Teiidae* )  
*Herpetologica*. 32, 395 – 399.
- BISCHOFF, Th.L.W. (1844) Mémoire sur la maturation et la chute périodique de l'oeuf de l'homme et des mammifères, indépendant de la fécondation.  
*Ann. Sci. Nat. . Sér. III, Vol.*, 2, 104 – 164.



- BISCHOFF, Th.L.W. (1847) Theorie der Befruchtung und über die Rolle, welche die Spermatozoïden dabei spielen.  
*Müller's Arch.* 1847, 421 – 442.
- BLACKER, A.W. and CASSIDY, D.M. (1980) Developmental and ploidy characteristics of "senescent" unfertilized eggs of *Xenopus laevis*.  
*J. Exp. Zool.*, 213, 105 – 116.
- BLANKENHORN, H.J. (1973) Zum Stand der Forschung über die Verbreitung der grünfrösche im Kanton Zürich.  
*Rev. Suisse Zool.*, 80, 656 – 662.
- BLANKENHORN, H.J. (1974) Soziale Organisation einer Mischpopulation von *Rana lessonae* Camerano und *Rana esculenta* Linnaeus.  
Thesis, Univ. of Zürich.
- BLANKENHORN, H.J., HEUSSER, H. and VOGEL, P. (1971) Drei Phänotypen von Grünfröschen aus dem *Rana esculenta* Komplex in der Schweiz.  
*Rev. Suisse Zool.*, 78, 1242 – 1247.
- BLOOM, S.E. (2) (1969) Chromosome abnormalities in early chicken (*Gallus domesticus*) embryos.  
*Chromosoma*, 28, 357 – 369.
- BLOOM, S.E. (1970) Haploid chicken embryos "Evidence for diploid and triploid cell populations".  
*J. Hered.*, 61, 147 – 150.
- BOEHME, W. (1975) Indizien für natürliche parthenogenese beim Helmbasilisken, *Basiliscus basiliscus* (Linnaeus, 1758).  
*Salamandra*, 11, 77 – 83.
- BOEHME, W. (1982) Butterfly agamas *Leiolepis – belliana – belliana* from the malay peninsula and their parthenogenetic lines. (Sauria, Uromastycidae)  
*Zool. Jahrb. Abt. syst. Oekol. Geogr. Tiere*, 109, 157 – 169.
- BOLKAY, S. (1901) On hybrid between *Rana esculenta* and *Rana ridibunda*.  
*Arch. Zool.*, 1, 25.
- BONNET, C. (1745) Traité d'Insectologie, ou Observations sur les Pucerons et sur quelques especes de Vers d'eau douce qui, coupés en morceaux, deviennent autant d'animaux complets. Paris.  
Réimprimé en: Oeuvre d'Histoire naturelle et de Philosophie. Tome premier, 1780. Marc – Michel Rey, Amsterdam.

- BONNET, R. (1900) Gibt es bei Wirbeltieren Parthenogenesis.  
*Anat. Hefte, 2 abt, Ergeb. Anat. und Anat. - Entwicklungsgesch.*, Bd IX,  
 820 – 870.
- BORGIA, G. (1980) Evolution of haplodiploidy: models for inbred and outbred  
 systems.  
*Theor. Popul. Biol.*, 17, 103 – 128.
- BOULANGER, G.A. (1885 – A) Catalogue of the lizards in the British Museum  
 (Natural History). Vol. I., 2nd ed.  
 Taylor and Francis, London.
- BOULANGER, G.A. (1885 – B) A description of the German river frog (*Rana  
 esculenta* var. *ridibunda* Pall.).  
*Proc. Zool. Soc. London*, 1885, 666 – 671.
- BOURGOIN, P., BAYLET, R., BALLON, C. et al (1965) Exploration d'une  
 hypothese sur l'etiopathogenie des moles hydatidiformes. Etude  
 chromosomique.  
*Dakar Rev. Fr. Gynecol.*, 60, 673 – 684.
- BROADLEY, D.G. (1974) *Typhlina bramina* (Daudin) – A cosmopolitan  
 all – female parthenogenetic species of blind snake.  
*J. Herpetol. Assoc. Afr.*, 12, 24 – 26.
- BROWN, W.M. and WRIGHT, J.W. (1979) Mitochondrial DNA analyses and  
 the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus  
*Cnemidophorus* ).  
*Science*, 203, 1247 – 1249.
- BULGER, A.J. and SCHULTZ, R.J. (1979) Heterosis and Interclonal variation  
 in thermal tolerance in unisexual fishes.  
*Evolution*, 33, 848 – 859.
- BURNETT. (1857) On the significance of cell – segmentation, and the relations  
 of this process to the phenomena of reproduction.  
*Proc. Am. Acad. Arts Sci.* , 3, 43 – 47.
- BURT, C.E. (1931) A study of the teiid lizards of the genus *Cnemidophorus* with  
 special reference to their phylogenetic relationships.  
*U.S. Nat. Mus. Bull.*, 154, 1 – 286.
- BUSNITA, Th., CHRISTIAN, A., STEOPOE, NEDELA and DRAGOTOZU

- (1955) Contributions la cunoasterca reproducerei la cara sul – argentin  
(*Carassius auratus gibelio* Bloch).  
*Biol. Inst. Cercetari piscicol.*, 14.
- BUSNITA, Th., CHRISTIAN, A., STEOPOE, NEDELA AND DRAGOTOZU  
Ginogeneza la Carasul Argentin ( *Carassius auratus gibelio* Bloch).  
*Commun. Acad. Rep. Pop., Rom.* 7.
- BUSS, E.G. (1977) Parthenogenetic development as a means of detecting female  
turkeys carrying autosomal mutants.  
*Genetics*, 86, S 9 (abstr.).
- BUSS, E.G. and OLSEN, M.W. (1968) Parthenogenesis in parental F – 1 and  
F – 2 populations of turkeys.  
*Genetics*, 60, S 166 (abstr.).
- BUZZO, K., FOUTS, D.L., and WOLSTENHOLME, D.R. (1978) EcoRI  
cleavage site variants of mitochondrial DNA molecules from rats.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75, 909 – 913.
- CABANNE, F. (1957) Les dysembryomes du testicle.  
*Arch. anat. pathol. Semaine hop.* 5 A 165 – A 182
- CAGLE, F.R. (1946) A lizard population on Tinian.  
*Copeia*, 1946, 4 – 9.
- CALLARD, I.P., CALLARD, G.V. and LANCE, V. (1979) Normammalian  
models in reproduction research (reptile, amphibian, fish).  
In: N.J. Alexander (Ed), *Animal Models for research on Contraception and  
Fertility*, 346 – 359, Harper & Row Ltd., London.
- CANTI, R.G. (1928) Cinematograph demonstration of living tissue cells growing  
in vitro.  
*Arch. Exp. Zellforsch.*, 6, 86 – 97.
- CAPUSO, P.A., MARSH, M.R., MINKOWITZ, S., and KARTEN, G. (1971)  
An intense clinicopathologic study of 305 teratoma of the ovary.  
*Cancer*, 27, 343 – 348.
- CARR, D.H. (1969) Cytogenetics and the pathology of hydatiform degeneration  
*Obstet. Gynecol.*, 33, 333 – 342.
- CAVAZZANI, T. (1907) Ueber die Entstehung der Teratoide des Hodens.  
Bemerkungen ueber eine angeborene Geschwulst des Hodens.  
*Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol.*, 41, 413 – 433.

- CHANG, M.C. (1950) Cleavage of unfertilized ova in immature ferrets.  
*Anat. Rec.*, 108, 31 – 43.
- CHECK, W. (1978) Chromosomes provide new view of hydatidiform moles.  
*J. Am. Med. Ass.*, 239, 399.
- CHERFAS, N.B. (1966 – A) Analysis of meiosis in sexual and uni sexual forms of the silver crucian carp.  
*Tr. Vses. Nauchnoissled. Inst., Prud. Rybn. Khoz.*, 14, 63 – 82. (Russian)
- CHERFAS, N.B. (1966 – B) Natural triploidy in females of the unisexual form of the goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch).  
*Genetika*, 5, 16 – 24.
- CHERFAS, N.B. (1969) Results of cytogenetica analysis of unisexual and bisexual forms of silver crucian carp.  
In: N.B. Cherfas (Ed), *Genetika, selekcija i gibrizacija ryb.*, 85 – 89 (in Russian), Moskou.
- CHERNOFF, B. MILLER, R.R. and GILBERT, C.R. (1982) *Notropis – orca* and *Notropis – simus*, cyprinid fishes from the american USA southwest with description of *Notropis – simus – pecosensis* new subspecies.  
*Occas. Pap. Mus. Zool. Univ. Mitch.*, 698, 49 p.
- CHOY, Y.M., LAU, K.M., and LEE, C.Y. (1979) Purification and characterization of urinary choriogonadotropin from patients with hydatidiform mole.  
*J. Biol. Chem.*, 254, 1159 – 1163.
- CHOY, Y.M., LAU, K.M., MA, P.H., and LEE, C.Y. (1978) Purification and characterization of choriogonadotropin from hydatidiform mole.  
*Clin. Chim. Acta*, 85, 7 – 15.
- CHRISTIANSEN, J.L. (1969) Notes on hibernation of *Cnemidophorus neomexicanus* and *C. inornatus* (*Sauria : Teiidae*).  
*J. Herpetol.*, 3, 99 – 100.
- CHRISTIANSEN, J.L. (1971) Reproduction of *Cnemidophorus inornatus* and *Cnemidophorus neomexicanus* (*Sauria : Teiidae*) in Northern New Mexico.  
*Am. Mus. Novit.*, No. 2442, 48pp.

- CHRISTIANSEN, J.L. (1973) Natural and artificially induced oviducal and ovarian growth in two species of *Cnemidophorus* (Sauria:Teiidae). *Herpetologica*, 29, 195 – 204.
- CHRISTIANSEN, J.L., DEGENHART, W.G. and WHITE, J.E. (1971) Habitat preferences of *Cnemidophorus inornatus* and *C. neomexicanus* with special reference to conditions contributing to their hybridization. *Copeia*, 1971 – II, 357 – 359.
- CHRISTIANSEN, J.L. and LADMAN, A.J. (1968) The reproductive morphology of *Cnemidophorus neomexicanus* x *Cnemidophorus inornatus* hybrid males. *J. Morphol.*, 125, 367 – 377.
- CIMINO, M.C. (1972 – A) Meiosis in triploid all – female fish. (*Poeciliopsis*, *Poeciliidae*) *Science*, 175, 1484 – 1486.
- CIMINO, M.C. (1972 – B) Egg production, polyploidization and evolution in a diploid all – female fish of the genus *Poeciliopsis*. *Evolution*, 26, 294 – 306.
- CIMINO, M.C. (1973 – A) Karyotypes and erythrocyte sizes of some diploid and triploid fishes of the genus *Poeciliopsis*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 30, 1736 – 1737.
- CIMINO, M.C. (1973 – B) Egg production, polyploidization and evolution in a triploid all – female fish of the genus *Poeciliopsis*. *Evolution*, 26, 294 – 306.
- CIMINO, M.C. (1974) The nuclear DNA content of diploid and triploid *Poeciliopsis* and other poeciliid fishes with reference to the evolution of unisexual forms. *Chromosoma*, 47, 297 – 307.
- CIMINO, M.C. and SCHULTZ, R.J. (1970) Production of a diploid male offspring by a gynogenetic triploid fish of the genus *Poeciliopsis*. *Copeia*, 1970, 760 – 763.
- CLANTON, W. (1934) An unusual situation in the salamander *Ambystoma jeffersonianum* (Green). *Occas. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.*, 290, 1 – 14.

- CLARKE, E. (1959) Functional hermaphroditism and self – fertilization in a serranid fish.  
*Science*, 129, 215 – 216.
- CLAUS, C. (1864) Beobachtungen über die Bildung des Insekteneies.  
*Z. wiss. Zool.*, XIV, 1864.
- COE, E.H. (1959) A line of maize with high haploid frequency.  
*Am. Nat.*, 93, 381 – 382.
- COLE, C.J. (1975) Evolution of parthenogenetic species of reptiles.  
In: R. Reinboth (Ed), *Intersexuality in the animal kingdom*.  
340 – 355. Springer Verlag – Berlin, Heidelberg & New York.
- COLE, C.J. (1978 – A) Parthenogenetic Lizards (Part III).  
*Science*, 201, 1154 – 1155. Also see Part I: Vanzolini, P.E.; Part II: Wright, J.W.; and Part IV: Cuellar, O.)
- COLE, C.J. (1978 – B) The value of virgin birth.  
*Nat. Hist., N.Y.*, 87, 56 – 63.
- COLE, C.J. (1979) Chromosome inheritance in parthenogenetic lizards and evolution of allopolyploidy in reptiles  
*J. Hered.*, 70, 95 – 102.
- COLE, C.J., LOWE, C.H. and WRIGHT, J.H. (1969) Sex chromosomes in teiid whiptail lizards genus (*Cnemidophorus* ).  
*Am. Mus. Novit.*, 2395, 1 – 14.
- COLE, C.J., and TOWNSEND, C.R., (1977) Parthenogenetic reptiles: new subjects for laboratory research.  
*Experientia*, 33, 285 – 289.
- CORFMAN, P.A., and RICHART, R.M. (1964) Chromosome number and morphology of benign ovarian cystic teratomas.  
*New Engl. J. Med.*, 271, 1241 – 1244.
- COSTE, J.J.M.C.V. (1849) Histoire générale et particuliere du développement des corps organisés, 1847 – 1859.  
V. Masson, Paris.
- COURRIER, R. (1923) Vésicule blastodermique parthénogénétique dans un ovaire de cobaye impubere.  
*Arch. Anat. Strasbourg*, 2, 453 – 459.

- CREWDS, D. and FITZGERALD, K.T. (1980) Sexual behaviour in parthenogenetic lizards ( *Cnemidophorus* ).  
*Proc. Natl. Acad. Nat. Sci., USA*, 77, 499 – 502.
- CROW, J.F. and KIMURA, M. (1965) Evolution in sexual and asexual populations.  
*Am. Nat.*, 94, 439 – 450.
- CUELLAR, H.S. (1978) Continuance of circannual reproductive refractoriness in pinealectomized parthenogenetic whiptails ( *Cnemidophorus uniparens* ).  
*J. Exp. Zool.*, 206, 207 – 214.
- CUELLAR, H.S. and CUELLAR, O. (1977 – A) Absence of gonadal refractoriness in the lizards *Cnemidophorus uniparens* and *Sceloporus graciosus* *Copeia*, 1977 – I, 185 – 188.
- CUELLAR, H.S., and CUELLAR, O. (1977 – B) Evidence for endogenous rhythmicity in the reproductive cycle of the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus uniparens* (*Reptilia:Teiidae*).  
*Copeia*, 1977, 554 – 557.
- CUELLAR, H.S. and CUELLAR, O. (1977 – C) Refractoriness in female lizard reproduction: a probable circannual clock.  
*Science*, 197, 495 – 497.
- CUELLAR, O. (1968) Additional evidence for true parthenogenesis in lizards of the genus *Cnemidophorus*.  
*Herpetologica*, 24, 146 – 150.
- CUELLAR, O. (1970) Egg transport in lizards.  
*J. Morphol.*, 130, 129 – 135.
- CUELLAR, O. (1971) Reproduction and the mechanism of meiotic restitution in the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus uniparens*.  
*J. Morphol.*, 133, 139 – 165.
- CUELLAR, O. (1974) On the origin of parthenogenesis: the cytogenetic factors.  
*Am. Nat.*, 108, 625 – 648.
- CUELLAR, O. (1976 – A) Cytology of meiosis in the triploid gynogenetic salamander *Ambystoma tremblayi*.  
*Chromosoma*, 58, 355 – 364.

- CUELLAR, O. (1976 – B) Intraclonal histocompatibility in a parthenogenetic lizard: evidence of genetic homogeneity.  
*Science*, 193, 150 – 153.
- CUELLAR, O. (1977 – A) Genetic homogeneity and speciation in the parthenogenetic lizards *Cnemidophorus velox* and *C. neomexicanus*: evidence from intraspecific histocompatibility.  
*Evolution*, 31, 24 – 31.
- CUELLAR, O. (1977 – B) Animal parthenogenesis. A new evolutionary – ecological model is needed.  
*Science*, 197, 837 – 843.
- CUELLAR, O. (1978) Parthenogenetic Lizards (Part IV).  
*Science*, 201, 1155. (Also see Part I: Vanzolini, P.E.; Part II: Wright, J.E.; and Part III: Cole, C.J.)
- CUELLAR, O. (1979) On the ecology of coexistence in parthenogenetic and bisexual lizards of the genus *Cnemidophorus*.  
*Am. Zool.*, 19, 773 – 786.
- CUELLAR, O. (1981) Long – term analysis of reproductive periodicity in the lizard *Cnemidophorus uniparens*.  
*Am. Midl. Nat.*, 105, 93 – 101.
- CUELLAR, O. and KLUGE, A.G. (1972) Natural parthenogenesis in the gekkonid lizard *Lepidodactylus lugubris*  
*J. Genet.*, 61, 14 – 26.
- CUELLAR, O. and McKINNEY, C.O. (1976) Natural hybridization between parthenogenetic and bisexual lizards: detection of uniparental source by skin grafting.  
*J. Exp. Zool.*, 196, 341 – 350.
- CZECZOWICZ, K. and SKOWERSKA, M. (1977) Contribution to studies on parthenogenesis in mammals.  
*Acta Biol. Katowice*, 4, 51 – 54. (In Polish, with English abstract.)
- DALCQ, A. (1929) A propos des effets de l'irradiation des gametes chez les amphibiens.  
*Arch. Anat. Microsc.*, 25, 336 – 371.
- DANIELYAN, F.D. (1965) Mechanisms of reproductive isolation in some Armenian forms of rock lizards ( *Lacerta saxicola* Eversmann )  
*Biol. Zh. Arm. Akad. Nauk. Arm.*, S.S.R., 18, 75 – 80. (in Russian)



- DANIELYAN, F.D. (1967) New data on the ranges of certain subspecies of rock lizards ( *Lacerta saxicola* Eversmann ) in Armenia.  
*Biol. Zh. Arm. Akad. Nauk. Arm., S.S.R.,* 20, 99 – 102. (in Russian)
- DANIELYAN, F.D. (1971 – B) The effects of unfavourable environmental conditions on the eggs of parthenogenetic and bisexual forms of Armenian rock lizards during incubation  
*Biol. Zh. Arm. Akad. Nauk. Arm., S.S.R.,* 24, 118 – 119. (in Russian)
- DANIELYAN, F.D. (1971 – A) Some data on the comparative embryo – genesis of bisexual and parthenogenetic forms of Armenian Rock lizards.  
*Biol. Zh. Arm. Akad. Nauk. Arm., S.S.R.,* 24 (10), 56 – 62.
- DANIELYAN, F.D. (1971 – C) A comparative study of the population density and migrations of parthenogenetic and bi sexual rock lizards in Armenia.  
*Zool. Zh. Akad. Nauk. Arm., S.S.R.,* 50(1), 145 – 147. (Russian, English summary)
- DANIELYAN, F.D. and AIKAZYAN, A.K. (1974) New type of embryonic deformity in the parthenogenetic species of rock lizard *Lacerta – armeniaca*.  
*Biol. Zh. Arm. Akad. Nauk. Arm., S.S.R.,* 27 (2), 99 – 101.
- DARCEY, K.M. (1968) A cytological study of the origin of diploidy in the parthenogenetic turkey.  
M.S. Thesis, Pennsylvania State University.
- DARCEY, K.M. and BUSS, E.G. (1968) On the origin of the diploid number of chromosomes in the parthenogenetic turkey.  
*Genetics,* 60, 171. (Abstract)
- DARCEY, K.M., BUSS, E.G., BLOOM, S.E. and OLSEN, M.W. (1971) A cytological study of early cell populations in developing parthenogenetic blastodiscs of the turkey.  
*Genetics,* 69, 479 – 489.
- DAREVSKY, I.S. (1957) Systematic and ecological aspects of the dispersal of the lizard *Lacerta saxicola* Eversmann in Armenia..  
*Zool. Sb. Akad. Nauk. Arm., S.S.R.,* 10, 27 – 57. (in Russian)
- DAREVSKY, I.S. (1958) Natural parthenogenesis in certain subspecies of *Lacerta saxicola* Eversmann.  
*Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R. Biol. Sci. Sect. ( Engl. transl. ),* 122, 877 – 879.

- DAREVSKY, I.S. (1962) On the origin and biological role of natural parthenogenesis in the polymorphous group of Caucasian rocky lizards *Lacerta saxicola* Eversmann.  
*Zool. Zh.*, 41, 397 – 408 (in Russian, English summary).
- DAREVSKY, I.S. (1966) Natural parthenogenesis in a polymorphic group of Caucasian rock lizards related to *Lacerta saxicola* Eversmann.  
*J. Ohio Herpetol. Soc.*, 5, 115 – 152.
- DAREVSKY, I.S. (1967) Caucasian rock lizards: systematics, ecology, and phylogenesis of the polymorphic groups of Caucasian rock lizards of the subgenus *Archaeolacerta*, 214 pp. (in Russian)
- DAREVSKY, I.S. (1971) Hybridization, parthenogenesis, and polyploidy – three successive stages in the process of morphogenesis in lizards. Summaries of Reports at the Scientific Accounting Session on the results of studies of 1970 in the Zoological Institute of the Academy of Sciences of the USSR, March 15 – 17, 1971, Nauka, Leningrad (in Russian).
- DAREVSKY, I.S. (1972) Neue Angaben zur Verbreitung einiger Arten und Unterarten von Fels eidechsen des Subgenus *Archaeolacerta* in der Türkei.  
*Bonn. Zool. Beitr.*, 23, 347 – 351.
- DAREVSKY, I.S. (1974) Гибридизация и партеногенез как факторы видообразования у пресмыкающихся.  
*Tr. Zool. Inst. Akad. Nauk. S.S.S.R.*, 53, 335 – 348. (in Russian)
- DAREVSKY, I.S. and DANIELYAN, F.D. (1968) Diploid and triploid progeny arising from natural mating of parthenogenetic *Lacerta armeniaca* and *L. unisexualis* with bisexual *L. saxicola valentini*.  
*J. Herpetol.*, 2, 65 – 69.
- DAREVSKY, I.S. and DANIELYAN, F.D. (1969) Diploid and triploid individuals in the offspring of parthenogenetic females of rock lizards naturally mating with males of close bisexual species *Lacerta – armeniaca*, *Lacerta – unisexualis*, *Lacerta – saxicola – Valentini*.  
*Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 184, 727 – 730. (in Russian)
- DAREVSKY, I.S. and KRASILNIKOV, E.N. (1965) Certain traits of the blood cells of triploid hybrids of the rock lizard, *Lacerta saxicola* Eversmann.  
*Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.*, 164, 709 – 711. (in Russian)

- DAREVSKY, I.S. and KULIKOVA, V.N. (1961) Natürliche Parthenogenese in der polymorphen Gruppe der Kaukasischen Felseidechse (*Lacerta saxicola* Eversmann).  
*Zool. Jahrb. Abt. Syst. Oekol. Geogr. Tiere*, 89, 119 – 176.
- DAREVSKY, I.S. and KULIKOVA, V.N. (1962) Taxonomical characters and certain peculiarities of the oogenesis of the hybrids between bisexual and parthenogenetical forms of *Lacerta saxicola* Eversmann.  
*Cytology (Moscow)*, 4, 160 – 170. (in Russian)
- DAREVSKY, I.S. and KULIKOVA, V.N. (1964) Natural triploidy in a polymorphic group of rock lizards, *Lacerta saxicola* Eversmann, resulting from hybridization between bisexual and parthenogenetic forms of this species.  
*Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.*, 158, 202 – 205. (in Russian)
- DAREVSKY, I.S., KUPRIYANOVA, L.A. and BAKRADZE, M.A. (1977) Residual bisexuality in parthenogenetic species of rock lizards of the genus *Lacerta*.  
*Zh. Obshch. Biol.*, 38, 772 – 780. (in Russian, with English abstract)
- DAREVSKY, I.S., KUPRIYANOVA, L.A. and BAKRADZE, M.A. (1978) Occasional males and intersexes in parthenogenetic species of Caucasian rock lizards genus *Lacerta*.  
*Copeia*, 1978 – II, 201 – 207.
- DAREVSKY, I.S., UZZELL, T.M., KUPRYANOVA, L.A. and DANIELYAN, F.D. (1973) Triploid hybrid males in sympatric populations of some parthenogenetic and bisexual species of rock lizards of the ( genus *Lacerta* L.)  
*Bull. Moscow Soc. Nat., Biol. Ser.*, 78, 48 – 58 (Russian, English summary).
- DARNELL, R.M. and ABRAMOFF, P. (1968) Distribution of the gynogenetic fish, *Poecilia formosa*, with remarks on the evolution of the species.  
*Copeia*, 1968, 354 – 361.
- DARNELL, R.M., LAMB, E. and ABRAMOFF, P. (1967) Matroclinous inheritance and clonal structure of a mexican population of the gynogenetic fish, *Poecilia formosa*.  
*Evolution*, 21, 168 – 173.
- DAWID, I.B. (1972 – A) Mitochondrial RNA in *Xenopus laevis* I. The expression of the mitochondrial genome.  
*J. Mol. Biol.*, 63, 201 – 216.

- DAWID, I.B. (1972 – B) Evolution of mitochondrial DNA sequences in *Xenopus*  
*Dev. Biol.*, 29, 139 – 151.
- DE FORD, L.S., BUSS, E.G., TODD, P. and WOOD, J.C.S. (1979) Estimation  
of haploid cell content of parthenogenetic turkey embryos: a  
cytofluorometric study.  
*J. Exp. Zool.*, 210, 301 – 306.
- DEWEY, M.J., MARTIN, D.W., MARTIN, G.R. and MINTZ, B. (1977) Mosaic  
mice with teratocarcinoma – derived mutant cells deficient in hypoxanthine  
phosphoribosyltransferase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5564 – 5568.
- DEHNER, H. (1872) Ueber die sogenannte parthenogenetische Furchung des  
Froscheies.  
*Verh. phys. – med. Ges. Würzburg, N.F.*, Bd. 26.
- DELAGE, Y. (1913)  
*Biologica*, 1913.
- DELAGE, Y. and GOLDSMITH, M. (1913) La Parthénogénese naturelle et  
expérimentale.  
Flammarion, Paris, 1913.
- DIXON, F.J. and MOORE, R.A. (1953) Testicular tumors. A clinicopathological  
study.  
*Cancer*, 6, 427 – 454.
- DOLIDZE, A.I., KHACHAPURIDZE, V.T. and KURDOVANIDZE, I.L. (1967)  
Embryonic parthenogenesis in follicular mice oocytes.  
*Tr. Nauck – issled. Inst. Fiziol. Patol. Zhenshchiny*, 3, 529 – 534.
- DRIAGHIN, P.A. (1949)  
*Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.*, 66, 121 – 123. DOBROVOLSKAJA, H. (1964)  
A case of an adult male appearance in a population of the  
parthenogenetic subspecies *Lacerta saxicola dahli* Darevsky from Armenia.  
*Zool. Pol.*, 14 (1 – 2), 9 – 14.
- DOWNS, F.L. (1978) Unisexual *Ambystoma* from the Bass islands of Lake Erie.  
*Occas. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.*, 685, 1 – 36.
- DUBOIS, A. and GUENTHER, R. (1982) Klepton and synklepton: 2  
evolutionary systematic categories in zoology.  
*Zool. Jahrb. Abt. Syst. Oekol. Geogr. Tiere*, 109, 290 – 305.

- DUELLMAN, W.E. and WELLMAN J. (1960) A systematic study of the lizards of the *depei* group (genus *Cnemidophorus*) in Mexico and Guatemala. *Publ. Mus. Zool. Univ. Mich.*, 111, 1 – 80.
- DUELLMAN, W.E. and ZWEIFEL, R.G. (1962) A synopsis of the lizards of the *sexlineatus* group (genus *Cnemidophorus*) *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 123, 55 – 210.
- DUNN, G.R., and STEVENS, L.C. (1970) Determination of sex of teratomas derived from early mouse embryos. *J. Natl. Cancer Inst.*, 44, 99 – 105.
- DUVAL, M. (1884) De la formation du Blastoderme dans l'oeuf d'Oiseau. *Ann. Sci. Nat.*, t. XVIII.
- DZIERZON. (1845) Gutachten über die von Hrn. Direktor Stöhr im ersten und zweiten Kapitel des General – Gutachtens aufgestellten Fragen. *Bienenztg*, 1, 109 – 113, 119 – 123.
- DZIERZON. (1848) Theorie und Praxis des neuen Bienen fremde oder neue Art der Bienenzucht mit dem günstigsten Erfolge. Brigg.
- ECHELLE, A.A. and MOSIER, D.I. (1982) *Menidia* – *clarkhubbsi* new – species. (Pisces, Atherinidae). An all female species. *Copeia*, 1982, 533 – 540.
- ECKHARDT, M.J. and WHIMSTER, W. (1971) Skin homografts in the all – female gekkonid lizard *Hemidactylus garnotii*. *Copeia*, 1971, 152 – 154.
- EDWARDS, R.G. (1954) The experimental induction of pseudogamy in early mouse embryos. *Experientia*, 10, 499.
- ENDO, S. and TAKAGI, N. ( 1981) A preliminary cytogenetic study of X chromosome inactivation in diploid parthenogenetic embryos from LT – Sv mice. *Jpn. J. Genet.*, 56, 349 – 356.
- ENGELMANN, W – E. (1972) Disk – Elektrophorese der Serumproteine von Wasserfröschen. Ein Beitrag zur Diskussion über den Hybridcharakter von *Rana esculenta* L. *Acta Biol. Med. Ger.*, 29, 431 – 435.

- ENGELMANN, W.E. (1973) Zur Fragen der verwandtschaftlichen Beziehungen europäischer Grünfrösche (Gattung *Rana*.) Eine vergleichende elektrophoretische Untersuchung der Serumproteine. *Zool. Jahrb. Abt. Syst. Oekol. Geogr. Tiere*, 100, 183 – 196.
- EPPIG, J.J. (1978) Granulosa cell deficient follicles. Occurrence, structure, and relationship to ovarian teratocarcinogenesis in strain LT/Sv mice. *Differentiation*, 12, 111 – 120.
- EPPIG, J.J., KOZAK, L.P., EICHER, E.M. and STEVENS, L.C. (1977) Ovarian teratomas in mice are derived from oocytes that have completed the first meiotic division. *Nature*, 269, 517 – 518.
- ERNST, L.K., GOLUBEV, A.K. and KYDRYAVTSEV, I.V. (1978) Prospects of development and practical importance of research on the transplantation of embryos and the cloning of mammals. *S. – Kh. Biol.*, 13, 659 – 666.
- ERNST, L.K., KUDRYAVTSEV, I.V. and GOLUBEV, A.K. (1980) Parthenogenesis and prospects for its use in cattle breeding. *S. – Kh. Biol.*, 15, 559 – 568.
- EVANS, R.W. (1957) Developmental stages of embryo – like bodies in teratoma testis. *J. Clin. Pathol.* 10, 31 – 39.
- FANKHAUSER, G. (1937) The sex of a haploid, metamorphosed salamander (*Triton taeniatus* Laur). *Genetics*, 22, 192 – 193.
- FANKHAUSER, G. (1938 – A) Triploidy in the common newt , *Triturus viridiscens*. *Anat. Rec.*, 70, suppl. no. 3, 27.
- FANKHAUSER, G. (1938 – B) The microscopical anatomy of metamorphosis in a haploid salamander, *Triton taeniatus* Laur. *J. Morphol.*, 62, 393 – 413.
- FANKHAUSER, G. (1938 – C) Sex differentiation in a haploid salamander, *Triton taeniatus* Laur. *J. Exp. Zool.*, 79, 35 – 49.
- FANKHAUSER, G. (1938 – D) Triploidy in the newt, *Triturus viridiscens*. *Proc. Am. Philos. Soc.*, 79, 715 – 739.

- FANKHAUSER, G. (1945) The effects of changes in chromosome number on amphibian development.  
*Q. Rev. Biol.*, 20, 20 – 78.
- FANKHAUSER, G. and HUMPHREY, R.R. (1959) The origin of spontaneous heteroploids in the progeny of diploid, triploid and tetraploid Axolotl females.  
*J. Exp. Zool.*, 142, 379 – 421.
- FARINA, E. (1976) Diploid gynogenesis in *Discoglossus pictus*.  
*Acta Embryol. Morphol. Exp.*, 3, 291 – 297.
- FECHHEIMER, N.S., ZARTMAN, D.L., and JAAP, R.G. (1968) Trisomic and haploid embryos of the chick (*Gallus domesticus*)  
*J. Reprod. Fertil.*, 17, 215 – 217.
- FOOTE, W.D., PHELPS, D.A., JESCH, J.M., RUSH, L. and TIBBITTS, F.D. (1975) Apparent cleavage of unfertilized bovine ova.  
*J. Anim. Sci.*, 41, 353. (Abstr.)
- FORBES, T.R. (1964) Intersexuality in reptiles.  
In: C.N. Armstrong and A.J. Marshall (Eds), *Intersexuality in Vertebrates including Man*, 273 – 283. Academic Press, London – New York.
- FOX, H. (1980) Advances in the Histopathology of Ovarian Tumours.  
In: C.E. Newman, C.H.J. Ford & J.A. Jordan (Eds), *Ovarian Cancer. Proceedings of the International Symposium on Ovarian Cancer. Birmingham, 24 – 25 September, 1979*, Pergamon Press, New York.
- FOX, H., and LANGLEY, F.A. (1976) Tumours of the Ovary. pp. 213 – 216.  
Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago.
- FRANKENBERG, E. (1982) Social behavior of the parthenogenetic indopacific *Gecko Hemidactylus – Garnotii*.  
*Z. Tierpsychol.*, 59, 19 – 28.
- FREYSE, K. and MUELLER, G. (1962) Die Parthenogenese bei *Lacerta saxicola armenica* Mahely, 1909.  
*Zool. Gart.*, 26 (new ser.), 348.
- FRIEDMAN, N.B., and MOORE, R.A. (1946) Tumors of the testis, a report on 922 cases.  
*Mil. Surgeon*, 99, 573 – 593.

- FRITTS, T.H. (1969) The systematics of the parthenogenetic lizards of the *Cnemidophorus cozumela* complex.  
*Copeia*, 1969, 519–535.
- GADOW, H. (1906) A contribution to the study of evolution based upon the Mexican species of *Cnemidophorus*.  
*Proc. Zool. Soc. Lond.*, 1906, 277–375.
- GAFFNEY, L.J. (1974) Genotypic characteristics of parthenogenetic turkeys.  
Ph.D. thesis, The Pennsylvania State Univ., 76 p.
- GAFFNEY, L.J. (1974) Gynotypic characteristics of parthenogenetic turkeys.  
*Diss. Abstr. I. t.*, 35, 1290–B.
- GAFFNEY, L.J. and BUSS, E.G. (1973) Evidence for homozygosity in Turkey parthenogens.  
*Genetics*, 74, S 87.
- GAGE.(1928) Parthenogenesis in Lampreys.  
*Anat. Rec.*, V, XVI.
- GAILLARD, J.A. (1955) Histogenese des dysembryomes et des tumeurs du testicle.  
*Bull. Assoc. Fr. Etude Cancer* 42, 486–495.
- GAILLARD, J.A. (1956) Histogénese des dysembryomes testiculaire. Les images initiales et les aspects évolutifs.  
*Bull. Assoc. Fr. Etude Cancer*, 43, 53–68.
- GAILLARD, J.A. (1957) Evolution unilatérale d'un dysembryome testiculaire. Histogenese et systématique du carcinome embryonnaire.  
*Bull. Assoc. Fr. Etude Cancer*, 44, 124–134.
- GAILLARD, J.A. (1958) Les dysembryomes polyembryoniques. Origine et destinée des boutons embryonnaires.  
*Bull. Assoc. Fr. Etude Cancer*, 45, 104–120.
- GAL, D., SIMPSON, E.R., PORTER, J.C., MacDONALD, P.C. and BUCHSBAUM, H.J. (1981) Failure of contraceptive steroids to modify human chorionic gonadotrophin secretion by hydatidiform mole tissue and choriocarcinoma cells in culture.  
*Steroids*, 37, 663–671.



- GASOWSKA, M. (1936) Der Giebel — — eine ostasiatische Silberkarausche (*Carassius auratus gibelio* Blochi).  
*Z. Fisch.*, 34, 719 — 726.
- GASPARD, U.J., REUTER, A.M., DEVILLE, J.L., VRINDTS — GEVAERT, Y., BAGSHAWE, K.D. and FRANCHIMONT, P. (1980) Serum concentration of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunits. 2. Trophoblastic tumours.  
*Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 13, 319 — 329.
- GERRITSEN, J. (1980) Sex and parthenogenesis in sparse populations.  
*Am. Nat.*, 115, 718 — 742.
- GLESENER, R.R., and TILMAN, D. (1978) Sexuality and components of environmental uncertainty — clues from geographic parthenogenesis in terrestrial animals.  
*Am. Nat.*, 112, 659 — 673.
- GOLOVINSKAJA, K.A. (1954) Reproduction and heredity of the silver carp.  
*Tr. Vses. Nauchnoisled Inst., Prud. Rybn. Khoz.*, 7, 34 (Russ.)
- GOLOVINSKAJA, K.A. (1960) On the male silver carps and their crossings with the carp.  
*Rybovodstvo i rybolovstvo*, 6, 16
- GOLOVINSKAJA, K.A. and ROMASOV, D.D. (1947) Research on the gynogenesis of the silver carp.  
*Tr. Vses. Nauchnoisled Inst., Prud. Rybn. Khoz.*, 4, 73 — 85 (in Russian)
- GOLOVINSKAJA, K.A., ROMASOV, D.D. and CHERFAS, N.B. (1965) Unisexual and bisexual forms of the silver carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch).  
*Vopr. Ichtiol.*, 5(4), 614 (in Russian).
- GOMELSKII, B.I. and CHERFAS, N.B. (1982) Hormonal inversion of sex as a method of studying the genetic regulation of natural gynogenesis in fish.  
*Dokl. Biol. Sci.*, (Engl. transl. Dokl. Akad. Nauk. SSSR), 263, 153 — 155.
- GOMELSKII, B.I. and CHERFAS, N.B. (1982) Hormonal sex inversion in females of the crucian carp *Carassius auratus* Gibelio uni sexual form.  
*Ontogenez*, 13, 235 — 242.
- GORUNOVA, A.I. (1960) On the reproduction of the silver crucian carp.  
*Vopr. Ichtiol.*, 1(5), 106 — 110 (in Russian).

- GÖTZ, B. (1931) Jungfräuliche Göttinnen und Gottesmütter.  
*Z. Sexualwissenschaft*, 18, 298 – 314.
- GRANT. (1958) Description of *Gymnophthalmus underwoodi* from Barbados.
- GRASSE, P.P. (1970) Parthenogenesis.  
 In: P.P. Grasse (Ed), *Traité de Zoologie; Anatomie, Systematique, Biologie*,  
 tome XIV. Fascicule III: Reptiles; Glandes Endocrines, Embryologie,  
 Systematique, Paleontologie, 972 – 978. Masson et Cie, Paris.
- GROUCHY, J. de (1980) Human parthenogenesis: a fascinating single event.  
*Biomed.*, 32, 51 – 53.
- GROVES, J.D. (1973) Delayed fertilization in the snake *Boiga dendrophila*.  
*Herpetologica*, 29, 20 – 22.
- GUNASEGARAM, R., PEH, K.L., LOGANATH, A., KARIM, S.M. and  
 RATNAM, S.S. (1982) Elevated intravesicular fluid luteinizing hormone  
 concentration in hydatidiform mole.  
*Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 89, 160 – 162.
- GUENTHER, R. (1968) Morphologische and ökologische Untersuchungen zur  
 Unterscheidung von *Rana esculenta* L. and *Rana ridibunda* Pall.  
*Zool. Jahrb. Abt. Syst. Oekol. Geogr. Tiere*, 95, 229 – 264.
- GUENTHER, R. (1969) Untersuchungen zum Artproblem an europäischen  
 Anuren der Gattung *Rana* (*Amphibia*).  
 Thesis, Humboldt – Univ. of Berlin.
- GUENTHER, R. (1970) Der Karyotyp von *Rana ridibunda* Pall. und das  
 Vorkommen von Triploidie bei *Rana esculenta* L. (*Anura, Amphibia*)  
*Biol. Zentralbl.*, 89, 327 – 342.
- GUENTHER, R. (1973) Ueber die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen  
 den europäischen Grünfröschen and dem Bastardcharakter von *Rana*  
*esculenta* L. (*Anura*).  
*Zool. Anz.*, 190, 250 – 285.
- GUENTHER, R. (1974) Neue daten zur verbreitung and ökologie der  
 Grünfrösche (*Anura, Ranidae*) in der DDR.  
*Mitt. Zool. Mus. Berl.*, 50, Heft 2, 287 – 298.
- GUENTHER, R. (1975 – A) Untersuchungen der Meiose bei Männchen von

*Rana ridibunda* Pall., *Rana lessonae* Cam. und der Bastardform "*Rana esculenta*" L. (*Anura*).  
*Zool. Anz.*, 190, 250 – 285.

GUENTHER, R. (1975 – B) Zum natürlichen Vorkommen und zur Morphologie triploider Teichfrösche, "*Rana esculenta*" L., in der DDR (*Anura, Ranidae*).  
*Mitt. Zool. Mus. Berl.*, 51, 145 – 148.

GUENTHER, R. and HAENEL, S. (1976) Untersuchungen über den Genfluss zwischen *Rana ridibunda* und *Rana lessonae* sowie die Rekombinationsrate bei der Bastardform *Rana "esculenta"* (*Anura, Ranidae*).  
*Zool. Anz.*, 197, 23 – 38.

HADLEY, N.F. and McCaleb, D.C. (1977) Changes in lipid composition of oocytes during vitellogenesis in the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus – uniparens* (*Reptilia, Lacertilia, Teiidae*).  
*J. Herpetol.*, 11, 411 – 414.

HALDANE, J.B.S. (1958) Parthenogenesis.  
*Triangle (Basel)*, 3, 142 – 149.

HALDANE, J.B.S. (1959) Parthenogenese.  
*Naturwiss. Rundsch.*, 12, 453 – 458.

HALL, W.P. (1970) Three probable cases of parthenogenesis in lizards CH(1) (*Agamadae, Chamaeleonidae, Gekkonidae*)  
*Experientia*, 26, 1271 – 1273.

HANEY, B.M. and OLSEN, M.W. (1958) Parthenogenesis in premature and newly laid turkey eggs.  
*J. Exp. Zool.*, 139, 469 – 478.

HARADA, K. and BUSS, E.G. (1977) Karyotype analysis of parthenogenetically developing turkey embryos.  
*Genetics*, 86, S 25 – S 26.

HARADA, K. and BUSS, E.G. (1978) Cytological study of early development of parthenogenesis in Turkey eggs.  
*Genetics*, 88, S 36 – S 37.

HARADA, K. and BUSS, E.G. (1981 – A) Turkey – chicken hybrids: a cytological study of early development.  
*J. Hered.*, 72, 264 – 266.

- HARADA, K. and BUSS, E.G. (1981 – B) Cytogenetic studies of embryos developing parthenogenetically in turkeys.  
*Poult. Sci.*, 60, 1362 – 1364.
- HARADA, K. and BUSS, E.G. (1981 – C) The chromosomes of turkey embryos during early stages of parthenogenetic development.  
*Genetics*, 98, 335 – 345.
- HARDY, L.M. and COLE, C.J. (1981) Parthenogenetic reproduction in lizards *Cnemidophorus – exsanguis*, histological evidence.  
*J. Morphol.*, 170, 215 – 238.
- HARTMAN, C.G. (1919) Studies in the development of the opossum *Didelphis virginia* L. III, IV.  
*J. Morphol.*, 32, 1 – 142.
- HARTMAN, M. (1909) Autogamie bei Protisten und ihre Bedeutung für das Befruchtungsproblem.  
*Arch. Protistenkd.*, 14, 264 – 334.
- HASKINS, C.P., HASKINS, E.F. and HEWITT, R.E. (1960) Pseudogamy as an evolutionary factor in the poeciliid fish *Mollienisia formosa*.  
*Evolution*, 14, 473 – 483.
- HAYASHI, K. and KAWAYANAGI, F. (1962) Parthenogenetic fission of the human ovarian follicle.  
*Jpn. J. Obstet. Gynec. Soc.*, 14, 358. (in Japanese)
- HAYS, F.A. and NICOLAIDES, C. (1934) Variability in development of fresh laid hen eggs.  
*Poult. Sci.*, 13, 74 – 91.
- HEALY, W.V., RUSSELL, P.S., POOLE, H.K. and OLSEN, M.W. (1962) A skin grafting analysis of fowl parthenogens: evidence for a new type of genetic histocompatibility.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 99, 698 – 705.
- HECHT, F., KAISER – McCRAW, B. and VYVIAL, T. (1981) Mapping the HLA gene cluster with parthenogenetic ovarian teratomas.  
*Pediatr. Res.*, 15, 563.
- HEMMER, H. (1973) Das Serumeiweissbild von *Rana ridibunda perezi* im

Rahmer des *Rana esculenta* – *lessonae* – *ridibunda* Komplexes ( *Salientia*, *Ranidae*).  
*Salamandra*, 9, 168 – 172.

HENSEL, K. (1971) Some notes on the systematic status of *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782) with further record of this fish from the Danube river in Czechoslovakia.  
*Vest. Cs. Spol. Zool.*, 35, 186 – 198.

HENSEN (1869) Ueber eine Züchtung unbefruchteter Eier.  
*Centralbl. med. Wiss.*, Nr. 26, 1869.

HERTWIG, G. (1918) Kreuzungsversuche an Amphibien.  
*Arch. mikrosk. Anat.*, 91, Abt. II.

HERTWIG, G. (1924) Trypaflavin als Radium – ersatz zur Gewinnung haploidkerniger Froschlarven.  
*Verh. Anat. Ges.*, 58, 223 – 227.

HERTWIG, G. and HERTWIG, P. (1920) Triploide Froschlarven.  
*Arch. mikrosk. Anat.*, 94, 34 – 54.

HERTWIG, O. (1906) Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere. Bd. I, 673.

HERTWIG, P. (1913) Das Verhalten des mit Radium bestrahlten Spermatochromotins im Froschei. Ein cytologischer Beweis für die parthenogenetische Entwicklung der Radiumlarven.  
*Arch. mikrosk. Anat.*, Bd. 81, 173 – 182.

HERTWIG, R. (1886) Gedächtnissrede auf Carl Theodor von Siebold.  
Verlag der K. Bayer. Akademie, München.

HEUSSER, H. and BLANKENHORN, H.J. (1973) Crowding – Experimente mit Kaulquappen aus homo – und heterotypischen Kreuzungen der Phänotypen *esculenta*, *lessonae* and *ridibunda* (*Rana esculenta* – Komplex, *Anura*, *Amphibia*).  
*Rev. Suisse Zool.*, 80, 543 – 569.

HIS, W. (1868) Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes. Die erste Entwicklung des Hünchens im Ei.  
F.C.W. Vogel, Leipzig.

- HOCH, L. and MORLOT, R. (1920) Evolution parthénogénétique dans l'ovule dans l'atrophie du follicule a l'état de maturité.  
*Rev. Méd. Est*, no. 17, tome 48.
- HOLCIK, J., and ZITNAU, R. (1978) On the expansion and origin of *Carassius auratus* in Czechoslovakia.  
*Folia Zool. Brno*, 27, 279 – 288.
- HONDA, J., YANAGIDA, K., SATO, E., SUGAWARA, N., MUNAKATA, S. and FUKUSHIMA, T. (1982) Incidence of hydatidiform mole and aging of mothers.  
*Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 34, 915 – 919.
- HOOGMOED, M.S. (1973) Notes on the herpetofauna of Surinam. IV. The lizards and amphisbaenians of Surinam.  
Thesis, Univ. of Leiden. Junk, The Hague.
- HOTZ, H. (1974) Ein Problem aus vielen Fragen – europäische Grünfrösche (*Rana esculenta* – Komplex) und ihre Verbreitung.  
*Natur und Mus.*, 104, 262 – 272.
- HOVASSE, R. (1920) Le nombre des chromosomes chez les têtards parthénogénétiques de grenouille.  
*C. R. Acad. Sci. Paris*, T. 170, 1211 – 1216.
- HOVASSE, R. (1922 – A) A propos du mécanisme autorégulateur du nombre des chromosomes chez les oeufs de batraciens, dans la parthénogénèse par piqure.  
*C. R. Soc. Biol. Paris*, T. 87, 899.
- HOVASSE, R. (1922 – B) Contribution à l'étude des chromosomes. Variation du nombre et régulation en parthénogénèse.  
*Bull. Biol.*, 56, 141 – 229.
- HOVASSE, R. (1922 – C) La régulation du nombre des chromosomes les embryons parthénogénétiques de grenouille. Son mécanisme.  
*C. R. Acad. Sci. Paris*, T 174, 72 – 74.
- HOVASSE, R. (1930) Régulation du nombre des chromosomes en parthénogénèse expérimentale chez grenouille et irrégularités du mécanisme des divisions de réduction.  
*C. R. Soc. Biol. Paris*, T. 105, 181 – 183.

- HOWELL, A.B. (1933) The involved genetics of fish.  
*Science*, 77, 389 – 390.
- HO YUEN, B. (1983) Relationship of prolactin and estradiol to human chorionic gonadotropin following molar gestation.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 145, 618 – 620.
- HO YUEN, B. and BURCH, P. (1983) Relationship of oral contraceptives and the intrauterine contraceptive devices to the regression of concentrations of the beta subunit of human chorionic gonadotropin and invasive complications after molar pregnancy  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 145, 214 – 217.
- HUBBS, C.L. (1943) Criteria for subspecies, species, and genera, as determined by researches on fishes.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 44, 109 – 121.
- HUBBS, C.L. (1955) Hybridization between Fish Species in Nature.  
*Syst. Zool.*, 4, 1 – 20.
- HUBBS, C.L. (1961) Isolating mechanisms in the speciation of fishes.  
In: W.F. Blair (Ed), Vertebrate speciation symposium, 5 – 23, University of Texas Press, Austin, Texas.
- HUBBS, C.L. (1964) Interactions between a bisexual fish species and its gynogenetic sexual parasite.  
*Texas Mem. Mus. Bull.*, 8, 1 – 72.
- HUBBS, C.L., DREWRY, G.E. and WARBURTON, B. (1959) Occurrence and morphology of a phenotypic male of a gynogenetic fish.  
*Science*, 129, 1227 – 1229.
- HUBBS, C.L. and HUBBS, L.C. (1932) Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin.  
*Science*, 76, 628 – 630.
- HUBBS, C.L. and HUBBS, L.C. (1946) Breeding experiments with the invariable female, strictly matroclinous fish, *Mollienisia formosa*.  
*Rec. Genet. Soc. Am.*, 14, 48 (Abstract).
- HUBBS, C.L. and HUBBS, L.C. (1946) Experimental breeding of the Amazon molly.  
*Aquarist's J.*, 17, 4 – 6.

- HULSE, A.C. (1981) Ecology and reproduction of the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus uniparens* (Teiidae).  
*Ann. Carnegie Mus.*, 50, 353 – 369.
- HUMPHREY, R.R. and FANKHAUSER, G. (1957) The origin of spontaneous and experimental haploids in the Mexican axolotl ( *Siredon* – or *Ambystoma – mexicanum*. )  
*J. Exp. Zool.*, 134, 427 – 447.
- HUNTER, W.F. and LENNOX, B. (1954) Sex of teratoma: preliminary communication.  
*Lancet*, 1954 II, 633.
- HUXLEY, J.S. (1920) Note on an alternating preponderance of males and females in fish, and its possible significance.  
*J. Genet.*, 10, 265 – 276.
- ISO Standards Handbook I. (1977) Information transfer, Handbook on International Standards governing information transfer. (Text of ISO standards)  
International Organization for standardization, Switzerland.
- ILLMENSEE, K. and STEVENS, L.C. (1979) Teratomas and chimeras.  
*Sci. Am.*, 240, 120 – 132.
- JACOBS, P.A., ANGELL, R.R., BUCHANAN, I.M., HASSOLD, T., MATSUYAMA, A.M. and MANUEL, B. (1978) The origin of human triploids.  
*Ann. Hum. Genet.*, 42, 49 – 57.
- JACOBS, P.A., HASSOLD, T.J., MATSUYAMA, A.M. and NEWLANDS, I.M. (1978) Chromosome constitution of gestational trophoblastic disease.  
*Lancet*, 1978 II, 49.
- JACOBS, P.A., HUNT, P.A., MATSUURA, J.S., WILSON, C.C. and SZULMAN, A.E. (1982) Complete and partial hydatidiform mole in Hawaii: cytogenetics, morphology and epidemiology.  
*Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 89, 258 – 266.
- JACOBS, P.A., SZULMAN, A.E., FUNKHOUSER, J., MATSUURA, J.S. and WILSON, C.C. (1982) Human triploidy: relationship between parental origin of the additional haploid complement and development of partial hydatidiform mole.  
*Ann. Hum. Genet.*, 46, 223 – 231.



- JACOBS, P.A., WILSON, C.M., SPRENKLE, J.A., ROSENSHEIN, N.B. and MIGEON, B.R. (1980) Mechanism of origin of complete hydatidiform moles.  
*Nature*, 286, 714 – 716.
- JANOSIK, J. (1896) Die Atrophie der Follikel und ein seltsames Verhalten der Eizelle.  
*Arch. mikrosk. Anat.*, 48, 169 – 181.
- JASINSKI, A. (1970) Parthenogenesis of vertebrates.  
*Wszechwiat*, 1, 5 – 9.
- Joint Project for Study of Choriocarcinoma and Hydatidiform Mole in Asia. (1959)  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 80, 178 – 196.
- JONES, E.C. (1970) Bibliography on atresia in the ovaries of vertebrates.  
*Bibliogr. Reprod.*, 15, 129 – 132 & 245 – 247.
- JOSWIAK, G.R., STASIAK, R.H. and MOORE, W.S. (1982) Allozyme analysis of the hybrid *Phoxinus eos* x *Phoxinus neogaeus* (Pisces, Cyprinidae) in Nebraska USA.  
*Can. J. Zool.*, 60, 968 – 973.
- KAJII, T. and OHAMA, K. (1977) Androgenetic origin of hydatidiform mole.  
*Nature*, 268, 633 – 634.
- KALLMAN, K.D. (1962 – A) Gynogenesis in the teleost, 1 *Mollinia formosa* Girard, with a discussion of the detection of parthenogenesis in vertebrates by tissue transplantation.  
*J. Genet.*, 58, 7 – 21.
- KALLMAN, K.D. (1962 – B) Population genetics of the gynogenetic teleost, *Mollinia formosa* (Girard).  
*Evolution*, 16, 497 – 504.
- KALLMAN, K.D. (1964) Homozygosity in a gynogenetic fish, *Poecilia formosa*.  
*Genetics*, 50, 260 – 261.
- KAMPMEIER, O.F. (1929) Problem of parthenogenesis in mammalian ovary.  
*Am. J. Anat.*, 43, 45 – 76.
- KAPLAN, C.G. ASKIN, F.B. and BENIRSCHKE, K. (1979) Cytogenetics of extragonadal tumors.  
*Teratology*, 19, 261 – 266.

- KASANSKY, W.J. (1935) Parthenogenetisch entwickelte junge Karpfen (*Cyprinus carpio* L.)  
*Zool. Anz.*, 110, 191 – 193.
- KHVATOV, B.P. (1968) The occurrence of parthenogenesis in an atretic follicle of a human ovary.  
*Arkh. Anat. Gistol. Embriol.*, 54, 93 – 96.
- KIESTER, A.R., NAGYLAKI, T. and SHAFFER, B. (1981) Population dynamics of species with gynogenetic sibling species.  
*Theor. Popul. Biol.*, 19, 358 – 369.
- KLAUSCH, B., STRAUBE, W., HOFMANN, R., BUETTNER, H.H., JENSSEN, H.L., KOEHLER, H. and GUENTHER, J. (1977) The macrophage electrophoretic mobility (mem) test for the diagnosis of hydatidiform mole and choriocarcinoma. Preliminary report.  
*Ann. Chir. Gynaecol.*, 66, 209 – 213.
- KLUGE, A.G. (1982) The status of the parthenogenetic gekkonid lizard *Gehyra variegata ogasawarasimae*.  
*J. Herpetol.*, 16, 86 – 87.
- KLUGE, A.G. and ECKHARDT, M.J. (1969) *Hemidactylus garnoti*, Durmèril and Bibron, a triploid all – female species of gekkonid lizard.  
*Copeia*, 1969, 651 – 664.
- KOBAYASI, H. (1971) A cytological study on gynogenesis of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*).  
*Zool. Mag.*, 80, 316 – 322.
- KOBAYASI, H. (1976) A cytological study on the maturation division in the oogenic process of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*).  
*Jpn. J. Ichthyol.*, 22, 234 – 240.
- KOBAYASI, H. (1977) Hybridization in Japanese funa *Carassius auratus*. In: S. Motoda (ed), Proceedings of the fifth Japan – Soviet Joint Symposium on Aquaculture, Sept. 1976, 193 – 208.
- KOBAYASI, H., NAKANO, K. and NAKAMURA, M. (1977) On the Hybrids, 4n Ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*) x Kinbuna (*C. auratus* subsp.), and their chromosomes. (Jap., with English summary.)  
*Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 43, 31 – 37.

- KOBAYASI, H. and KAWASHIMA, Y. (1971) On the chromosome studies of the Funa – carp hybrids. I. Gengorobuna (*Carassius auratus cuvieri*) x Carp (*Cyprinus carpio*).  
*Jpn. Womens's Univ. J.*, 18, 55 – 58.
- KOBAYASI, H. and KAWASHIMA, Y. (1972) On the chromosomes of an all – female population in the ginbuna, *Carassius auratus langsdorfii*.  
*Jpn. Women's Univ. J.*, 17, 259 – 263.
- KOBAYASI, H., KAWASHIMA, Y. and TAKEUCHI, N. (1970) Comparative chromosome study in the genus *Carassius*, especially with a finding of polyploidy in the ginbuna (*C. auratus langsdorfii*).  
*Jpn. J. Ichthyol.*, 17, 153 – 160.
- KOBAYASI, H. and OCHI, N. (1972) Chromosome studies of the hybrids Ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*) x Kinbuna (*Carassius auratus* subsp.) and ginbuna x loach (*Misgurnus anguillicaudatus*).  
*Zool. Mag.*, 81, 67 – 71.
- KODAMA, M., KODAMA, T., and TOTANI, R. (1981) Dissociation of chorioadenoma destruens from hydatidiform mole by urinary steroid analysis.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 141, 288 – 293.
- KOHORN, E.I. (1982) Hydatidiform mole and gestational trophoblastic disease in Southern Connecticut.  
*Obstet. Gynecol.*, 59, 78 – 84.
- KOELLIKER, A. (1880) Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Tiere.  
W. Engelmann, Leipzig, 1879.
- KOREF – SANTIBANES, S. and GUENTHER, R. 1980 Karyological and serological studies in *Rana lessonae*, *R. ridibunda* and in their hybrid *R. "esculenta"* (Amphibia, Anura).  
*Genetica*, 52/53, 195 – 207.
- KOSIN, I.L. (1945) Abortive parthenogenesis in the domestic chicken.  
*Anat. Rec.*, 91, 245 – 251.
- KOSIN, I.L. (1950) Morphology of moribund blastoderms in turkey eggs.  
*Poult. Sci.*, 29, 767. (abstract).

- KOSIN, I.L. (1955) Parthenogenetic development of a turkey egg germ disc following a period of incubation or storage.  
*Supplement to Progress Reports of the Poultry Council of the State College of Washington*, November 1955, 74–78.
- KOSIN, I.L. (1958) Time lag in identification of fertility in Broad Breasted Bronze eggs and its relation to hatchability and possible parthenogenesis.  
*Poult. Sci.*, 37, 1150–1153.
- KOSIN, I.L. and NAGRA, H. (1956) Frequency of Abortive Parthenogenesis in domestic turkey.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 93, 605–608.
- KOSIN, I.L. and SATO, I. (1960) A study of abnormalities in parthenogenetically developing germ discs and embryos of the domestic turkey.  
*J. Morphol.*, 103, 263–276.
- KOSIN, I.L., SATO, I. and NAGRA, H. (1958) Studies of parthenogenesis in the domestic turkey and chicken.  
In: Eleventh World's Poultry Congress, Mexico City, Mexico. Sept. 21–29, 1958.
- KOSIN, I.L., SATO, I. and NAGRA, H. (1962–A) Estudios sobre partenogénesis en el guajolote doméstico y en el pollo.  
In: *Memoria Del XI Congreso Mundial De Avicultura*, 49–55. (See English summary on pp. 743–744.)
- KOSIN, I.L., SATO, I. and NAGRA, H. (1962–B) Studies on parthenogenesis in the domestic turkey and chicken.  
In: *Memoria Del XI Congreso Mundial De Avicultura*, 743–744. (English summary) (See complete paper in spanish on pp. 49–55.)
- KOSIN, I.L. and WAKELY, W.J. (1950) Persistency of the functional capacity of breed heterologous turkey–semen.  
*Poult. Sci.*, 29, 258–263.
- KOUCKY, J.D. (1925) Ovarian Dermoids. A study of one hundred consecutive cases.  
*Ann. Surg.*, 81, 821–832.
- KRAFKA, J. (1936) Teratoma, an explanation of its cause based on the organizer theory of embryology.  
*Arch. Pathol.*, 21, 756–764.

- KRAFKA, J. (1939) Parthenogenetic cleavage in human ovary.  
*Anat. Rec.*, 75, 19 – 21.
- KUDRYAVSTEV, I., OSHCHEPKOVA, Z.A., ANTAL, V.D. and PTASHKINA, E.A. (1981) The predisposition of healthy and Rous Sarcoma virus infected hens to parthenogenesis.  
*Zh. Obshch. Biol.*, 42, 467 – 469.
- KUDRYAVSTEV, I., OSHCHEPKOVA, Z.A., GOLUBEV, A.K., YURCHENKO, O.P., ANTAL, V.D. and PTASHKINA, E.A. (1980) Parthenogenesis in hens and possibility of its application in poultry.  
*S. – Kh. Biol.*, 15, 431 – 435.
- KUDRYAVSTEV, I., OSHCHEPKOVA, Z.A., PTASHKINA, E., GOLUBEV, A. and YURCHENKO, O. (1979) The potential for parthenogenesis in fowls.  
*Ptitsevodstvo*, 6, 23 – 24 (in Russian).
- KUNZ, J., and GENTON, C.Y. (1981) Aktuelle Diagnostik und Therapie gestationsbedingter trophoblastischer Tumoren: Erfahrungen an 24 Patientinnen.  
*Schweiz. Med. Wochenschr.*, 111, 85 – 97.
- KUPRIYANOVA, L.A. (1969) Karyological analysis of lizards of the subgenus *Archaeolacerta*.  
*Tsitologiya*, 11, 803 – 814 (in Russian).
- LANGHAUS, T. (1887)  
*Dtsche. Chir. (Abt. B)*, 50, 414.
- LANTZ, L.A. and CYREN, O. (1936) Contributions a la connaissance de *Lacerta saxicola* Eversmann.  
*Bull. Soc. Zool. Fr.*, 61, 159 – 181.
- LA RIVERS, I. (1948) Some Hawaiian ecological notes.  
*Wasmann Collect.*, 7, 85 – 110.
- LAU, H. (1894) Die parthenogenetische furchung des Hühnereies.  
Inaug. Diss., Dorparth, 48 p.
- LAWLER, S.D., FISHER, R.A., PICKTHALL, V.J., POVEY, S. and EVANS, M.W. (1982) Genetic studies on hydatidiform moles. The origin of partial moles.  
*Cancer Genet. Cytogenet.*, 5, 309 – 320.

- LAWLER, S.D., PICKTHALL, V.J., FISHER, R.A., POVEY, S., EVANS, M.W. and SZULMAN, A.E. (1979) Genetic studies of complete and partial hydatidiform moles.  
*Lancet*, 1979 II, 580.
- LAWLER, S.D., POVEY, S., FISHER, R.A. and PICKTHALL, V.J. (1982) Genetic studies on hydatidiform moles. II. The origin of complete moles.  
*Ann. Hum. Genet.*, 46, 209 – 222.
- LECAILLON, A. (1908 – A) Sur la modifications qui peuvent se produire dans la structure de la cicatricule de l'oeuf non fécondé des Oiseaux.  
*C. R. Séances Soc. Biol.*, No. 14, séance du 11 avril 1908, 647 – 649.
- LECAILLON, A. (1908 – B) Sur les changements qui se produisent, apres la ponte, dans l'aspect extérieur de la cicatricule de l'oeuf non fécondé de la Poule.  
*C. R. Séances Soc. Biol.*, No. 21, séance du 13 juin 1908, 1034 – 1036.
- LECAILLON, A. (1909 – A) Sur la segmentation parthénogénésique de l'oeuf des Oiseaux.  
*C. R. Séances Acad. Sci.*, séance du 4 janvier 1909, 52 – 53.
- LECAILLON, A. (1909 – B) Sur la segmentation de l'oeuf non fécondé du Paon (*Pavo cristatus* L.)  
*C. R. Séances Soc. Biol.*, No. 3, séance du 23 janvier 1909, 143 – 145.
- LECAILLON, A. (1909 – C) La segmentation parthénogénésique chez la Poule qui ne s'est jamais accouplée (1re note).  
*C. R. Séances Soc. Biol.*, No. 21, séance du 12 juin 1909, 966 – 968.
- LECAILLON, A. (1909 – D) La segmentation parthénogénésique chez la Poule qui ne s'est jamais accouplée (2e note).  
*C. R. Séances Soc. Biol.*, No. 23, séance du 26 juin 1909, 1053 – 1055.
- LECAILLON, A. (1909 – E) Sur la dégénérescence qui subit la cicatricule de l'oeuf non fécondé des Oiseaux.  
*C. R. Séances Soc. Biol.*, No. 24, séance du 3 juillet 1909, 31 – 34.
- LECAILLON, A. (1909 – F) Sur la présence de spheres attractives et de centrosomes dans les cellules issues de la segmentation parthénogénésique de l'oeuf de la Poule, et sur les caracteres de ces formations.  
*C. R. Séances Acad. Sci.*, séance du 5 juillet 1909, 64 – 66.

- LECAILLON, A. (1910 – A) Influence de la température sur la segmentation et la dégénérescence de l'oeuf non fécondé de la Poule.  
C. R. Séances Soc. Biol., séance du 9 avril 1910, 593 – 594.
- LECAILLON, A. (1910 – B) La variation du nombre des chromosomes dans la segmentation de l'oeuf non fécondé de la Poule.  
C. R. Séances Soc. Biol., séance du 2 juillet 1910, 2 juillet 1910, 34 – 36.
- LECAILLON, A. (1910 – C) Relation entre les phénomènes de parthénogenèse naturelle rudimentaire et ceux de parthénogenèse expérimentale.  
C. R. Séances Soc. Biol., séance du 16 juillet 1910, 123 – 125.
- LECAILLON, A. (1910 – D) Relation entre les phénomènes de parthénogenèse naturelle rudimentaire et ceux de parthénogenèse naturelle totale.  
C. R. Séances Soc. Biol., séance du 23 juillet 1910, 187 – 189.
- LECAILLON, A. (1910 – E) Les divisions cellulaires dans la segmentation de l'oeuf non féconde des Oiseaux.  
Assoc. des Anatomistes, Congres de Bruxelles, 1910.
- LECAILLON, A. (1910 – F) La parthénogenèse chez les oiseaux. Segmentation et dégénérescence de l'oeuf non fécondé.  
Arch. Anat. Microsc., 12, 511 – 638.
- LEE, J.N., SALEM, H.T., AL-ANI, A.T., CHARD, T., HUANG, S.C., OUYANG, P.C., WEI, P.Y., and SEPPAELAE, M. (1981) Circulating concentrations of specific placental proteins (human chorionic gonadotropin, pregnancy specific beta-1 glycoprotein, and placental protein 5) in untreated gestational trophoblastic tumors.  
Am. J. Obstet. Gynecol., 139, 702 – 704.
- LELIEVRE, PEYRON, and CORSY. (1927) La parthénogenèse dans l'ovaire des mammifères et le problème de l'origine des embryomes.  
Bull. Assoc. Fr. Cancer, 16, 711.
- LESLIE, J.F. (1977) Variation in the gynogenetic fish *Poeciliopsis -2 monacha - lucida*.  
Bull. N.Y. Acad. Sci., 22, 48.
- LESLIE, J.F. and VRIJENHOEK, R.C. (1977) Genetic analysis of natural populations of *Poeciliopsis monacha*: allozyme inheritance and pattern of mating.  
J. Hered., 68, 301 – 306.

- LESLIE, J.F. and VRIJENHOEK, R.C. (1978) Genetic dissection of clonally inherited genomes of *Poeciliopsis*. Part 1. Linkage analysis and preliminary assessment of deleterious gene loads.  
*Genetics*, 90, 801 – 812.
- LEUCK, B.E. (1982) Comparative burrow use and activity patterns of parthenogenetic and bi sexual whiptail lizards *Cnemidophorus*. (Teiidae).  
*Copeia*, 1982 – 2, 416 – 424.
- LEUCKART, R. (1853) Zeugung.  
In: R. Wagner, Handwörterbuch der Physiologie, . Bd. 4.
- LEUCKART, R. (1858) Zur Kenntnis des Generationswechsels und der Parthenogenesis bei den Insekten.  
Frankfurt am Main.
- LILLIE, F.R. (1919) The development of the chick, 30 – 31.  
Henry Holt & Co., New York.
- LIEDER, U. (1955 – A) Männchenmangel und natürliche Parthenogenese bei der Silberkarausche *Carassius auratus gibelio* (Vertebrata, Pisces)  
*Naturwissenschaften*, 42, 590.
- LIEDER, U. (1955 – B) Der Giebel – – unsere interessanteste Fischart.  
*Dtsch. Fischer – Ztg.* 2.
- LIEDER, U. (1956) Ergebnisse und Probleme der Chromosomenforschung bei unseren Nutzfischen.  
*Albrecht Thaer Arch.*, 1 H. 3.
- LIEDER, U. (1959) Ueber die Eientwicklung bei mänchenlosen Stämmen der Silberkarausche *Carassius auratus gibelio* (Bloch) (Vertebrata, Pisces).  
*Biol. Zentralbl.*, 78, 284 – 291.
- LINDER, D. (1969) Gene loss in human teratomas.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63, 699 – 705.
- LINDER, D., HECHT, F., McCAW, B.K., and CAMPBELL, J.R. (1975 – B) Origin of extragonadal teratomas and endodermal sinus tumors.  
*Nature*, 254, 597 – 598.
- LINDER, D. and POWER, J. (1970) Further evidence for post – meiotic origin of teratomas in the human female.  
*Ann. Hum. Genet.*, 34, 21 – 30.



- LINDER, D., McCAW, B.K. and HECHT, F. (1975) Parthenogenetic origin of benign ovarian teratomas.  
*New Engl. J. Med.*, 292, 63 – 66.
- LOEB, J. (1921) Further observations on the production of parthenogenetic frogs.  
*J. Gen. Physiol.*, 3, 539 – 546.
- LOEB, L. (1901) On progressive changes in the ova in mammalian ovaries.  
*J. Med. Res.*, 1, 1901.
- LOEB, L. (1905 – A) Über chorionepitheliomartige Gebilde im Ovarium des Meerschweinchens und über ihre wahrscheinliche Entstehung aus parthenogenetisch sich entwickelnden Eiern.  
*Arch. mikrosk. Anat.*, 65, 259 – 282.
- LOEB, L. (1905 – B) Über hypertrophische Vorgänge bei der Follikelatresie nebst Bemerkungen über die Oocyten in den Markstrengen und über Teilungserscheinungen am Ei im Ovarium des Meerschweinchens.  
*Arch. mikrosk. Anat.*, 65, 728 – 753.
- LOEB, L. (1911) The parthenogenetic development of ova in the mammalian ovary and the origin of ovarian teratoma Chorionepitheliomata.  
*J. Am. Med. Assoc.*, 56, 1327.
- LOEB, L. (1911) Ueber Chorionepitheliomartige Gebilde im Ovarium des Meerschweinchens und über ihre wahrscheinliche Entstehung aus parthenogenetisch sich entwickelnden Eiern.  
*Z. Krebsforsch.*, 11, 259 – 282.
- LOEB, L. (1915) An early stage of an experimentally produced extrauterine pregnancy and the spontaneous parthenogenesis of the eggs in the ovary of the Guinea pig.  
*Biol. Bull.*, 28, 59 – 76.
- LOEB, L. (1930) The parthenogenetic development of eggs in the ovary of the Guinea Pig.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 27, 413 – 416.
- LOEB, L. (1932) The parthenogenetic development of eggs in the ovary of the guinea pig.  
*Anat. Rec.*, 51, 373 – 408.

- LOKKI, J. (1976) Genetic polymorphism and evolution in parthenogenetic animals. VIII. Heterozygosity in relation to polyploidy.  
*Hereditas*, 83, 65 – 72.
- LONGO, F.J. (1974 – A) An ultrastructural analysis  
*Anat. Rec.*, 179, 27 – 55.
- LONGO, F.J. (1974 – B) Ultrastructural changes in rabbit eggs aged in vivo.  
*Biol. Reprod.*, 11, 22 – 39.
- LONGO, F.J. (1980) Aging of mouse eggs in vivo and in vitro.  
*Gamete Res.*, 3, 379 – 393.
- LORENTZ, F.W. (1950) Onset and duration of fertility in turkeys.  
*Poult. Sci.*, 29, 20 – 26.
- LORENTZ, F.W. (1975) Influence of age on avian gametes.  
In: *Aging Gametes*, Int. Symp., Seattle 1973, 278 – 299. Karger, Basel.
- LOUIS, P. (1961) De la Génération des Animaux.  
Texte établi et traduit par P. Louis.  
Société d'édition, Paris.
- LOVERIDGE, A. (1945) Reptiles of the Pacific World.  
Macmillan, New York.
- LOWE, C.H. and WRIGHT, J.W. (1964) Species of the *Cnemidophorus exsanguis* subgroup of whiptail lizards.  
*J. Ariz. Acad. Sci.*, 3, 78 – 80.
- LOWE, C.H. and WRIGHT, J.W. (1966 – A) Evolution of parthenogenetic species of *Cnemidophorus* (whiptail lizards) in western North America.  
*J. Ariz. Acad. Sci.*, 4, 81 – 87.
- LOWE, C.H. and WRIGHT, J.W. (1966 – B) Chromosomes and karyotypes of cnemidophorine teiid lizards.  
*Mamm. Chrom. Newsl.*, 22, 199 – 210.
- LOWE, C.H., WRIGHT, J.W., COLE, C.J. and BEZY, R.L. (1970 – A) Natural hybridization between the teiid lizards *Cnemidophorus sonora* (parthenogenetic) and *Cnemidophorus tigris* (sexual).  
*Syst. Zool.*, 19, 114 – 127.
- LOWE, C.H., WRIGHT, J.W., COLE, C.J. and BEZY, R.L. (1970 – B)

- Chromosomes and Evolution of the species groups of *Cnemidophorus* (*Reptilia :Teiidae*).  
*Syst. Zool.*, 19, 128 – 141.
- LOWE, C.H. and ZWEIFEL, R.G. (1952) A new species of whiptail lizard (genus *Cnemidophorus*) from New Mexico.  
*Bull. Chic. Acad. Sci.*, 9, 229 – 247.
- LURAIN, J.R., BREWER, J.I., TOROK, E.E. and HALPERN, B. (1983) Natural history of hydatidiform mole after primary evacuation.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 145, 591 – 595.
- LUSK, S. and BARUS, V. (1978) Morphometric features of *Carassius auratus* from the drainage of the Morava river.  
*Folia Zool. Brno*, 27, 177 – 190.
- LUSK, S., BARUS, V. and VESELY, V. (1977) On the question of the occurrence of *Carassius auratus* L. in the Morava river watershed.  
*Folia Zool. Brno*, 26, 377 – 381.
- LUSTED, D. (1963) Parthenogenesis and viral tumors.  
*Hartford Hosp. Bull.*, 18, 202 – 207.
- LYON, M.F. (1961) Gene action in the X – chromosome of the mouse.  
*Nature*, 190, 372 – 373. LYON, M.F. (1972) X – chromosome inactivation and developmental patterns in mammals.  
*Biol. Rev.*, 47, 1 – 35.
- MacGREGOR, H.C. and UZZELL, T.M. (1964) Gynogenesis in salamanders related to *Ambystoma jeffersonianum*.  
*Science*, 143, 1043 – 1045.
- MAGEE, S.M. and PHILIPP, D.P. (1982) Biochemical genetic analysis of the grass carp *Ctenopharyngodon idella* female x bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* F – 1 hybrid and the parental species.  
*Trans AM. Fish Soc.*, 111, 593 – 602.
- MAGNUSSON, W.E. (1979) Production of an embryo by an *Acrochordus javanicus* isolated for seven years.  
*Copeia*, 1979, 744 – 745.
- MAKEYEVA, A.P. (1975) Occurrence of hybrid gynogenesis with fishes.  
*Vopr. Ikhtiol.*, (SSSR), 15, 83 – 93. (in Russian)

- MAKEYEVA, AP. (1976) On the nature of matroclinous individuals among the offspring of remote hybridization of fishes. (in Russian, English summary). *Genetika (Moskva)*, (SSSR), 12, (11), 72 – 82.
- MANDEVILLE, L.C. and SPURWAY, H. (1949) The development of hybrids between *Rana esculenta* Linn. and *Rana ridibunda* Pallas. *Brit. J. Herpetol.*, 2, 39 – 50.
- MANN, M.C. (1924) Cytological changes in the unfertilized tubal eggs of the rat. *Biol. Bull.*, 46, 316.
- MARCIAL – ROJAS, P.A., and MEDINA, R. (1958) Cystic teratomas of the ovary. A clinical and pathological analysis of 268 tumors. *Arch. Pathol.*, 66, 577 – 589.
- MAKINO, S. and MOMMA, E. (1949) An idiogram study of the chromosomes in some species of reptiles. *Cytologia (Tokyo)*, 15, 96 – 108.
- MARIN – PADILLA, M. (1965) Parthenogenesis in human teratomas. *Trans. New Engl. Obstet. Gynecol. Soc.*, 19, 91 – 96.
- MARKERT, C.L. (1982) Parthenogenesis, homozygosity, and cloning in mammals. *J. Hered.*, 73, 390 – 397.
- MARSDEN, S.J. and MARTIN, J.H. (1946) Turkey Management. *The Interstate*, III, Dansville.
- MARSDEN, S.J. and OLSEN, M.W. (1974) Longevity in Domestic Turkey. *World's Poultr. Sci. J.*, 30, 42 – 45.
- MARTIN, G.R., EPSTEIN, C.J., TRAVIS, B., TUCKER, G., YATZIV, S., MARTIN, D.W., CLIFT, S., and COHEN, S. (1978) X – chromosome inactivation during differentiation of female teratocarcinoma stem cells in vitro. *Nature*, 271, 329 – 333.
- MASLIN, T.P. (1962) All female species of the lizard genus *Cnemidophorus*. *Teiidae*. *Science*, 135, 212 – 213.
- MASLIN, T.P. (1966) The sex of hatchlings of five apparently unisexual species of whiptail lizards ( *Cnemidophorus*, *Teiidae* ). *Am. Midl. Nat.*, 76, 369 – 378.

- MASLIN, T.P. (1967) Skin grafting in the bisexual teiid lizard *Cnemidophorus sexlineatus* and in the unisexual *C. tessellatus*.  
*J. Exp. Zool.*, 166, 137 – 150.
- MASLIN, T.P. (1968) Taxonomic problems in parthenogenetic vertebrates.  
*Syst. Zool.*, 17, 219 – 231.
- MASLIN, T.P. (1971 – A) Conclusive evidence of parthenogenesis in three species of *Cnemidophorus* (*Teiidae*).  
*Copeia*, 1971, 156 – 158.
- MASLIN, T.P. (1971 – B) Parthenogenesis in reptiles.  
*Am. Zool.*, 11, 361 – 380.
- MASLIN, T.P., BIEDLEMAN, R.G. and LOWE, Jr. C.H. (1958) The status of the lizard *Cnemidophorus perplexus* Baird and Girard (*Teiidae*).  
*Proc. U.S. Natl. Mus.*, 108, 331 – 345.
- MASSART, C., LE POGAMP, C. and NICOL, M. (1983) La 17 beta hydroxysteroïde d'eshydrogénase sérique et tissulaire et les oestrogènes dans la mole hydatiforme.  
*J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 21, 77 – 82.
- MASSON, P. (1956) Tumeurs humaines.  
Librairie Maloine, Paris.
- MASUKO, K. and TOJO, S. (1981) Cyclic nucleotides and cellular kinetics in normal and abnormal human trophoblastic tissue.  
*Arch. Gynecol.*, 230, 335 – 344.
- MAU, K. – G. (1978) Nachweis natürlicher Parthenogenese bei *Lepidodactylus – lugubris* durch Gefangenschaftsnachzucht (Reptilia, Sauria, Gekkonidae).  
*Salamandra*, 14, 90 – 97.
- MAYR, E. (1963) Names given to hybrids.  
*Bull. Zool. Nomencl.*, 20, 50 – 51.
- MAYR, E. (1963) Animal Species and Evolution, 400 – 480.  
The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

- McBURNEY, M.W., and ADAMSON, E.D. (1976) Studies on the activity of the X chromosomes in female teratocarcinomacells in culture.  
*Cell*, 9, 57 – 70.
- McCARTNEY, M.G. (1951) The physiology of reproduction in turkeys. 2. Degree and duration of fertility and hatchability in broody and non – broody pullets.  
*Poult. Sci.*, 30, 663 – 667.
- McCAW, B.K., HECHT, F., LINDER, D., LOVRIEN, E.W., WYANDT, H., BACON, D., CLARK, B., and LEA, N. (1976) Ovarian teratomas: cytological data.  
In: D. Bergsma, (Ed), Human gene mapping 3, 391 – 395. Karger, Basel.
- McCAW, B.K. and LATT, S.A. (1977) X Chromosome replication in parthenogenetic benign ovarian teratomas.  
*Hum. Genet.*, 38, 253 – 264.
- McCAW, B.K., and VYVIAL, T. (1981) Mapping the HLA gene cluster with parthenogenetic ovarian teratomas.  
*Pediatr. Res.*, 15, 563. (abstract 724).
- McCORRISTON, C.C. (1968) Racial incidence of hydatidiform mole.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 101, 377 – 382.
- McCOY, C.J., Jr. and MASLIN, T.P. (1962) A review of the teiid lizard *Cnemidophorus cozumelus* and the recognition of a new race, *Cnemidophorus cozumelus rodecki*.  
*Copeia*, 1962, 620 – 627.
- McDOWELL, S.B. (1974) A catalogue of the snakes of New Guinea and the Solomons, with special reference to those in the Bernice P. Bishop Museum, Part I. Scolecophidia.  
*J. Herpetol.*, 8, 1 – 57.
- McKAY, F.E. (1971) Behavioral aspects of population dynamics in unisexual – bisexual *Poeciliopsis* (*Pisces* : *Poeciliidae*).  
*Ecology*, 52, 778 – 790.
- McKINNEY, C.O., KAY, F.R. and ANDERSON, R.A. (1973) A new all – female species of the genus *Cnemidophorus*.  
*Herpetologica*, 29, 361 – 366.

- MEAD, G.W. (1960) Hermaphroditism in archibenthic and pelagic fishes of the order *Iniomi*.  
*Deep – Sea Res.*, 6, 234 – 235.
- MEDICA, P.A. (1967) Food habits, habitat preference, reproduction, and diurnal activity in four sympatric species of whiptail lizards (*Cnemidophorus*) in South Central New Mexico.  
*Bull. South. Calif. Acad. Sci.*, 66, 251 – 276.
- MEIER, H., MYERS, D.D., FOX, R.R., and LAIRD, C. (1970) Occurrence, pathological features, and propagation of gonadal teratomas in inbred mice and the rabbit.  
*Cancer Res.* 30, 30 – 34.
- MELANDER, Y., and MONTEN, E. (1950) Probable parthenogenesis in *Coregonus*.  
*Hereditas*, 36, 105 – 106.
- MELNIKER, L.A., and SLAVUTIN, L.J. (1980) Prostatic tissue in a benign cystic teratoma of the ovary.  
*Diagn. Gynecol. Obstet.* , 2, 139 – 145.
- MELICOW, M.M. (1955) Classification of tumors of testis : A clinical and pathological study based on 105 primary and 13 secondary cases in adults, and 3 primary and 4 secondary cases in children.  
*J. Urol.* 73, 547 – 574.
- MENCZER, J., MODAN, M., and SERR, D.M. (1980) Prospective follow – up of patients with hydatidiform mole.  
*Obstet. Gynecol.*, 55, 346 – 349.
- MENZELL, B.W. and DARNELL, R.M. (1973 – A) Systematics of *Poecilia mexicana* (*Pisces: Poeciliidae*) in northern Mexico.  
*Copeia*, 1973, 225 – 237.
- MENZELL, B.W., and DARNELL, R.M. (1973 – B) Morphology of naturally – occurring triploid fish related to *Poecilia formosa*.  
*Copeia* , 1973, 350 – 352.
- MERTENS, R. (1950) Ueber Reptilienbastarde.  
*Senckenbergiana* , 31, 127 – 144.
- MERTENS, R. (1956) Ueber Reptilienbastarde, II.  
*Senckenb. Biol.* , 37, 383 – 394.

- MERTENS, R. (1959) La vie des Amphibiens et Reptiles.  
*Horizon de France*, Paris, 148.
- MEIJER, H. (1938) Investigations concerning the reproductive behaviour of  
*Mollienisia formosa*.  
*J. Genet.*, 36, 329 – 368.
- MEIJERS, L.M. (1959) Sex chromatin in teratomas.  
*J. Pathol. Bacteriol.*, 78, 43 – 55.
- MEYER, R. (1925) Ueber Teratome (Dermoid Cystome) des Ovariums mit  
freien Beckenende und Extremitäten.  
*Arch. Gynecol.*, 123, 714 – 764.
- MICHALSKI, J.V. (1948) Spontaneous aberrations in chromosome number  
(triploidy and haploidy) among larvae of the 2 – lined salamander, *Eurycea  
bilineata*.  
*Anat. Rec.*, 100, 64.
- MILLER, R.R. (1960) Four new species of viviparous fishes, genus *Poeciliopsis*,  
from northwestern Mexico.  
*Occas. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.*, no. 619, 1 – 11.
- MILLER, R.R. (1975) Five new species of Mexican poeciliid fishes of the genera  
*Poecilia*, *Gambusia*, and *Poeciliopsis*.  
*Occas. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.*, no. 672, 1 – 144.
- MILLER, R.R. and SCHULTZ, R.J. (1959) All – female strains of the teleost  
fishes of the genus *Poeciliopsis*.  
*Science*, 130, 1655 – 1657.
- MILSTEAD, W.W. (1957 – A) Observations on the natural history of four  
species of whiptail lizard, *Cnemidophorus* (*Sauria*, *Teiidae*) in  
Trans – Pecos Texas.  
*Southwest Nat.*, 2, 105 – 121.
- MILSTEAD, W.W. (1957 – B) Some aspects of competition in natural  
populations of Whiptail Lizards. (genus *Cnemidophorus* ).  
*Texas J. Sci.*, 9, 410 – 447.
- MILSTEAD, W.M. (1965) Changes in competing populations of whiptail lizards  
(*Cnemidophorus*) in southwestern Texas.  
*Am. Midl. Natur.*, 73, 75 – 80.



- MINTON, S.A., Jr. (1954) Salamanders of the *Ambystoma jeffersonianum* complex in Indiana.  
*Herpetologica*, 10, 173 – 179.
- MINTON, S.A., Jr. (1958) Observations on amphibians and reptiles of the Big Bend Region of Texas.  
*Southwest Nat.*, 3, 28 – 54.
- MINTZ, B., CRONMILLER, C. and CUSTER, R.P. (1978) Somatic cell origin of teratocarcinomas.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2834 – 2838.
- MINTZ, B., and ILLMENSEE, K. (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3585 – 3589.
- MITTWOCH, U. (1978) Virgin birth (human, mouse, chicken, turkey, lizard).  
*New Sci.*, 78, 750 – 752.
- MITTWOCH, U. (1978) Parthenogenesis.  
*J. Med. Genet.*, 15, 165 – 181.
- MIYAKE, A., AONO, T., KURACHI, H., TSUTSUMI, H., and KURACHI, K. (1981) Restoration of the ovarian response to gonadotropins in patients after molar abortion.  
*Obstet. Gynecol.*, 58, 566 – 568.
- MONACO, P.J., RASCH, E.M., and BALSANO, J.S. (1981) Sperm availability in naturally occurring bisexual – unisexual breeding complexes involving *Poecilia mexicana* and the gynogenetic teleost *Poecilia formosa*.  
*Environ. Biol. Fishes*, 6, 159 – 166.
- MOORE, J.J., Jr., WORKMAN, L., and WHITSETT, J.A. (1982) Trophoblastic cells of the hydatidiform mole contain a beta 1 – subtype adrenergic receptor.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55, 341 – 346.
- MOORE, K.L., and BARR, M.L. (1957) The sex chromatin in human malignant tissues.  
*Br. J. Cancer*, 11, 384 – 390.
- MOORE, W.S. (1971) The population ecology of unisexual – bisexual species complexes in the genus *Poeciliopsis* (Pisces: Poeciliidae).  
Ph.D. Thesis, Univ. of Connecticut.

- MOORE, W.S. (1975) Stability of small unisexual – bisexual populations of *Poeciliopsis* (Pisces: Poeciliidae).  
*Ecology*, 56, 791 – 808.
- MOORE, W.S. (1976) Components of fitness in the unisexual fish *Poeciliopsis monacha – occidentalis*.  
*Evolution*, 30, 564 – 578.
- MOORE, W.S. (1977 – A) A histocompatibility analysis of inheritance in the unisexual fish *Poeciliopsis 2 monacha – lucida*.  
*Copeia*, 1977(2), 213 – 223.
- MOORE, W.S. (1977 – B) An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates.  
*Q. Rev. Biol.*, 52, 263 – 278.
- MOORE, W.S. and EISENBREY, A.B. (1979) The population structure of an unisexual vertebrate *Poeciliopsis – monacha – lucida* (Pisces: Poeciliidae).  
*Evolution*, 33, 563 – 578.
- MOORE, W.S. and HINES, W.G.S. (1981) Sex in random environments.  
*J. Theor. Biol.*, 92, 301 – 316.
- MOORE, W.S. and McKAY, F.E. (1971) Coexistence in unisexual – bisexual species complexes of *Poeciliopsis* (Pisces: Poeciliidae).  
*Ecology*, 52, 791 – 799.
- MOORE, W.S., MILLER, R.S. and SCHULTZ, R.J. (1970) Distribution, adaption and probable origin of an all – female form of *Poeciliopsis* (Pisces: Poeciliidae) in Northwestern Mexico.  
*Evolution*, 24, 789 – 795.
- MOSINGER, M. (1961) Sur la carcinorésistance du cobaye. I. Les tumeurs spontanés du cobaye.  
*Bull. Cancer (Paris)*, 48, 217 – 235.
- MOTTA MAÏA (1877) Einiges über den Bau der unbefruchteten gelegten Eier einer Turbeltaube.  
*Mitt. Embryol. Inst. Univ. Wien*, Bd. 1, 85 – 94, t. VIII.
- MURAMOTO, J. (1975) A note on triploidy of the Funa (Cyprinidae, Pisces).  
*Proc. Jpn. Acad.*, 51, 583 – 587.
- NACE, G.W., RICHARDS, C.M., ASHER, J.H., Jr. (1970) Parthenogenesis and

- genetic variability. Part I. Linkage and inbreeding estimations in the frog *Rana pipiens*.  
*Genetics*, 66, 349 – 368.
- NAGY, A. and CSANYI, V. (1978) Utilization of gynogenesis in genetic analysis and practical animal breeding.  
In: International Seminary on increasing the productivity of fishes by selection and hybridization, 16 – 30. (19 – 23 September, 1978)  
Szarvas, Hungary.
- NAGY, A. and CSANYI, V. (1982) Changes of genetic parameters in successive gynogenetic generations and some calculations for carp gynogenesis.  
*Theor. Appl. Genet.*, 63, 105 – 110.
- NARBEL – HOFSTETTER, M. (1964) Les altérations de la accent !! méiose chez les animeaux parthénogénétiques.  
*Protoplasmatologia – Handbuch der protoplasmaforschung*, Band VI, F2, 1 – 163.
- NATOLI, W.J., and RASHAD, M.N. (1972) Hawaiian moles.  
*Am. J. Roentgenol.*, 114, 142 – 144.
- NEAVES, W.B. (1969 – A) Adenosine deaminase phenotypes among sexual and parthenogenetic lizards in the genus *Cnemidophorus* ( *Teiidae* ).  
*J. Exp. Zool.* , 171, 175 – 184.
- NEAVES, W.B. (1969 – B) Gene dosage at the lactate dehydrogenate b locus in triploid and diploid teiid lizards ( *Cnemidophorus* ).  
*Science*, 164, 557 – 559.
- NEAVES, W.B. (1971) Tetraploidy in a hybrid lizard of the genus *Cnemidophorus* ( *Teiidae* ).  
*Breviora*, Nr. 381, 25pp.
- NEAVES, W.B. and GERALD, P.S. (1968) Lactate dehydrogenase isozymes in parthenogenetic teiid lizards ( *Cnemidophorus* ).  
*Science*, 160, 1004 – 1005.
- NEAVES, W.B. and GERALD, P.S. (1969) Gene dosage at the lactate dehydrogenase b locus in triploid and diploid teiid lizards ( *Cnemidophorus* ).  
*Science*, 164, 557 – 559.
- NICHOLSON, G.W. (1929) The histogeny of teratomata.  
*J. Pathol. Bacteriol.* , 32, 365 – 386.

- NICOLAS, J.F., GAILLARD, J., JACOB, H., and JACOB, F. (1980) Bone-forming cell line derived from embryonal carcinoma cells. *Nature*, 286, 716–718.
- NIEKERK, C.H. van, and GERNEKE, W.H. (1966) Persistence and parthenogenetic cleavage of tubal ova in the mare. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 33, 195–232.
- NIKOLSKI, G.W. (1957) *Spezielle Fischkunde*. Berlijn.
- NISHIMURA, R., ASHITAKA, Y., and TOJO, S. (1979) The clinical evaluation of the simultaneous measurements of human chorionic gonadotropin (hCG) and its alpha-subunit in sera of patients with trophoblastic diseases. *Endocrinol. Jpn.*, 26, 575–583.
- NORGAARD-PEDERSEN, B. and RAGHAVAN, D. (1980) Germ cell tumours: a collaborative review. *Oncodev. Biol. Med.*, 1, 327–358.
- NORRIS, H.J., and CHORLTON, I. (1974) Functioning tumors of the ovary. *Clin. Obstet. Gynaecol.*, 17, 189–228.
- NUSSBAUM, R.A. (1980) The Brahminy blind snake (*Ramphotyphlops - braminu*)s in the Seychelles Archipelago: distribution, variation, and further evidence for parthenogenesis. *Herpetologica*, 36, 215–221.
- OELLACHER, J. (1872) Die Veränderungen des unbefruchteten Keimes des Hühneries im Eileiter und bei Bebrutungsversuchen. *Z. Wiss. Zool.*, 22, 181–234, t. XIII–XV.
- OJIMA, Y. and ASANO, N. (1977) A cytological evidence for gynogenetic development of the Ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*). *Proc. Jpn. Acad.*, 53, 138–142.
- OJIMA, Y., HAYASI, M. and UENO, K. (1975) Triploidy appeared in the backcross offspring from funa-carp crossing. *Proc. Jpn. Acad.*, 51, 702–706.
- OLIVER, J.H., Jr. (1971) Introduction to the symposium on parthenogenesis. M.S. Thesis, Pennsylvania State Univ.

- OLSEN, M.W. (1942 – A) Maturation, fertilization and early cleavage in the egg of the domestic fowl.  
Thesis Ph.D., Univ. of Maryland.
- OLSEN, M.W. (1942 – B) Maturation, fertilization and early cleavage in the hen's egg.  
*J. Morphol.*, 70, 513 – 533.
- OLSEN, M.W. (1956) Fowl Pox Vaccine associated with Parthenogenesis in Chicken and Turkey Eggs.  
*Science*, 124, 1078 – 1079.
- OLSEN, M.W. (1959) Fatherless turkey.  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 134, 8.
- OLSEN, M.W. (1960 – A) Performance record of a Parthenogenetic Turkey Male.  
*Science*, 132, 1661.
- OLSEN, M.W. (1960 – B) Nine Year Summary of Parthenogenesis in Turkeys.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 105, 279 – 281.
- OLSEN, M.W. (1961) Rous Sarcoma Virus associated with Parthenogenesis in Turkey Eggs.  
*Nature*, 190, 191 – 192.
- OLSEN, M.W. (1962 – A) Killed – virus vaccines in relation to parthenogenetic development in Turkey eggs.  
*Am. J. Vet. Res.*, 23, 855 – 857.
- OLSEN, M.W. (1962 – B) The occurrence and possible significance of parthenogenesis in eggs of mated turkeys.  
*J. Genet.*, 58, 1 – 6.
- OLSEN, M.W. (1962 – C) Polyembryony in unfertilized turkey eggs.  
*J. Hered.*, 53, 125 – 129.
- OLSEN, M.W. (1965 – A) Delayed Development and Atypical Cellular Organization in Blastodiscs of Unfertilized Turkey Eggs.  
*Dev. Biol.*, 12, 1 – 14.
- OLSEN, M.W. (1965 – B) Twelve year summary of selection for parthenogenesis in Beltsville small white turkeys.  
*Br. Poult. Sci.*, 6, 1 – 6.

- OLSEN, M.W. (1966 – A)    Frequency of Parthenogenesis in Chicken Eggs.  
*J. Hered.*, 57, 23 – 25.
- OLSEN, M.W. (1966 – B)    Segregation and Replication of Chromosomes in Turkey Parthenogenesis.  
*Nature*, 212, 435 – 436.
- OLSEN, M.W. (1966 – C)    Parthenogenesis in eggs of White Leghorn Chickens following an outbreak of Visceral lymphomatosis.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122, 977 – 980.
- OLSEN, M.W. (1967 – A)    Age as a factor influencing the level of parthenogenesis in eggs of turkeys.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124, 617 – 619.
- OLSEN, M.W. (1967 – B)    Early development of unfertilized turkey and chicken eggs.  
*World's Poult. Sci. J.*, 23, 242 – 245.
- OLSEN, M.W. (1968 – A)    Incidence of parthenogenesis in eggs of various strains and varieties of domestic turkeys, *Meleagris gallopato*.  
*Poult. Sci.*, 47, 1030 – 1032.
- OLSEN, M.W. (1968 – B)    Frequency of 3 mal positions among full – term parthenogenetic embryos.  
*Poult. Sci.*, 47, 1587 – 1589.
- OLSEN, M.W. (1968 – C)    Changes in level of parthenogenetic development in turkey eggs during two testing seasons.  
*Poult. Sci.*, 47, 2015 – 2016.
- OLSEN, M.W. (1969 – A)    Relationship of Turkey Eggs Showing Parthenogenetic Development to Those Containing Embryos or Hatching.  
*Poult. Sci.*, 48, 1349 – 1351.
- OLSEN, M.W. (1969 – B)    Comparative Weights and body lengths of parthenogenetic and normal turkey embryos.  
*Poult. Sci.*, 48, 711 – 713.
- OLSEN, M.W. (1969 – C)    Potential Uses of Parthenogenetic Development in Turkeys.  
*J. Hered.*, 60, 346 – 348.

- OLSEN, M.W. (1970) Weights of some internal organs and glands of fully developed parthenogenetic and normal turkey embryos.  
*Poult. Sci.*, 49, 1733 – 1735.
- OLSEN, M.W. (1972) Influence of turkey sires and dams on the level of parthenogenesis in eggs of their daughters.  
*Poult. Sci.*, 51, 2035 – 2039.
- OLSEN, M.W. (1973) Longevity and organ weights of Beltsville small white parthenogens and normal turkey males.  
*Poult. Sci.*, 52, 666 – 670.
- OLSEN, M.W. (1974) Frequency and cytological aspects of diploid parthenogenesis in turkey eggs.  
*Theor. Appl. Genet.*, 44, 216 – 221.
- OLSEN, M.W. and BUSS, E.G. (1967) Role of genetic factors and fowl pox virus in parthenogenesis in turkey eggs.  
*Genetics*, 56, 727 – 732.
- OLSEN, M.W. and BUSS, E.G. (1972) Segregation of two alleles for color of down in parthenogenetic and normal turkey embryos and poults.  
*Genetics*, 72, 69 – 75.
- OLSEN, M.W., MARKS, H.L., and WILSON, S.P. (1968) Parthenogenetic chick.  
*J. Hered.*, 59, 67 – 68.
- OLSEN, M.W. and MARSDEN, S.J. (1953) Embryonic development in Turkey Eggs laid 60 – 224 Days Following Removal of Males.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82, 638 – 641.
- OLSEN, M.W. and MARSDEN, S.J. (1954 – A) Development in unfertilized turkey eggs.  
*J. Exp. Zool.*, 126, 337 – 347.
- OLSEN, M.W. and MARSDEN, S.J. (1954 – B) Natural Parthenogenesis in Turkey Eggs.  
*Science*, 120, 545 – 546.
- OLSEN, M.W. and MARSDEN, S.J. (1954 – C) Parthenogenetic development in turkey and chicken eggs.  
*Poult. Sci.*, 33, 1075.

- OLSEN, M.W. and MARSDEN, S.J. (1954-D) Mortality among turkey embryos in relation to rate of embryonic development.  
*Poult. Sci.*, 33, 1146 – 1151.
- OLSEN, M.W. and MARSDEN, S.J. (1968) Incidence of parthenogenesis in eggs of various strains and varieties of domestic turkeys *Meleagris – gallopavo*.  
*Poult. Sci.*, 47, 1030 – 1032.
- OLSEN, M.W. and POOLE, H.K. (1962) Further Evidence of a Relationship between Live Fowl Pox Virus and Parthenogenesis in Turkey Eggs.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 109, 944 – 946.
- OLSEN, M.W., WILSON, S.P. and MARKS, H.L. (1968) Genetic Control of Parthenogenesis in Chickens.  
*J. Hered.*, 59, 41 – 42.
- OTT, J., HECHT, F., LINDER, D., LOVRIEN, E.W., and McCRAW, B.K. (1976) Human centromere mapping using terato data.  
*Cytogenet. Cell Genet.*, 16, 396 – 398.
- OTT, J., LINDER, D., McCRAW, B.K., LOVRIER, E.W., and HECHT, F. (1976) Estimating distances from the centromere by means of benign ovarian teratomas in man.  
*Ann. Hum. Genet.*, 40, 191 – 196.
- OWEN, R. (1849) On Parthenogenesis or the successive Production of Procreating Individuals from a single ovum.  
London, 1849.
- PACK, H.J. (1923) The food habits of *Cnemidophorus tessellatus tessellatus* (Say).  
*Proc. Biol. Soc. Wash.*, 36, 85 – 90.
- PAPAIOANNOU, V.E., GARDNER, R.L., McBURNEY, M.W., BABINET, C., and EVANS, M.J. (1978) Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 44, 93 – 104.
- PAPAIANNOU, V.E., McBURNEY, M.W., and GARDNER, R.L. (1975) Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos.  
*Nature*, 258, 70 – 73.
- PARK, W.W. (1971) Hydatidiform mole.



In: Chorio carcinoma: A study of its Pathology, 67. F.A. Davies Company, Philadelphia.

- PARKER, E.D., Jr. (1979 – A) Genetic and morphological consequences of parthenogenesis in the hybrid lizard *Cnemidophorus tesselatus*. Ph.D. thesis, Univ. of Rochester, 131 p.
- PARKER, E.D., Jr. (1979 – B) Genetic and morphological consequences of parthenogenesis in the hybrid lizard *Cnemidophorus tesselatus*. *Diss. Abstr. Int.*, 40, 569 – B.
- PARKER, E.D., Jr. (1979 – C) Phenotypic consequences of parthenogenesis in *Cnemidophorus* lizards. I. Variability in parthenogenetic and sexual populations. *Evolution*, 33, 1150 – 1166.
- PARKER, E.D., Jr. (1979 – D) Phenotypic consequences of parthenogenesis in *Cnemidophorus* lizards. II. Similarity of *C. tesselatus* to its sexual parental species. *Evolution*, 33, 1167 – 1179.
- PARKER, E.D., Jr. (1979 – E) Ecological implications of clonal diversity in parthenogenetic morphospecies. *Am. Zool.*, 19, 753 – 762.
- PARKER, E.D., Jr. and SELANDER, P.K. (1976) The organization of genetic diversity in the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus tesselatus*. *Genetics*, 84, 791 – 805.
- PARMENTER, C.L. (1920) The chromosomes of parthenogenetic frogs. *J. Gen. Physiol.*, 2, 205 – 206.
- PARMENTER, C.L. (1925) The chromosomes of parthenogenetic frogs and tadpoles. *J. Gen. Physiol.*, 8, 1 – 20.
- PARMENTER, C.L. (1926) Nucleoli in diploid and haploid tadpoles. *Anat. Rec.*, 34, 150.
- PARMENTER, C.L. (1932) Chromosome numbers and their origin in parthenogenetically developed larvae and frogs of *Rana pipiens* and *palustris*. *Anat. Rec.*, 54, 83.

- PARMENTER, C.L. (1933) Haploid, diploid, triploid and tetraploid chromosome numbers and their origin in parthenogenetically developed larvae and frogs of *Rana pipiens* and *Rana palustris*.  
*J. Exp. Zool.*, 66, 409 – 453.
- PARMENTER, C.L. (1940) Chromosome numbers in *Rana fusca* parthenogenetically developed from eggs with known polar body and cleavage history.  
*J. Morphol.*, 66, 241 – 260.
- PECCININI, D. (1971) Chromosome variation in populations of *Cnemidophorus lemniscatus* in the Amazon Valley ( *Sauria, Teiidae* ).  
*Ciencia Cult.*, 23, 133 – 136.
- PECCININI – SEALE, D. (1973) Chromosomal variation in the parthenogenetic and bisexual populations of *Cnemidophorus – lemniscatus* (Linnaeus) (Sauria, Teiidae) from the Amazonas valley. Proc. XII Int. Congr. Genetics.  
*Genetics*, suppl., 74, 209 – 210.
- PECCININI – SEALE, D. (1981) New Developments in vertebrate cytotaxonomy. IV Cytogenetic studies in reptiles.  
*Genetica*, 56, 123 – 148.
- PECCININI – SEALE, D. and FROTA – PESSOA, O. (1974) Structural heterozygosity in parthenogenetic populations of *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria:Teiidae) from the Amazonas Valley.  
*Chromosoma* , 47, 439 – 451.
- PENAZ, M., RAB, P. and PROKES, M. (1979) Cytological analysis, gynogenesis and early development of *Carassius auratus gibelio*.  
*Acta Sci. Nat.* (Brno), 13(7), 1 – 33.
- PENNOCK, L.A. (1965) Triploidy in parthenogenetic species of the Teiid Lizard genus *Cnemidophorus*.  
*Science*, 149, 539 – 540.
- PETERS, G. (1963) Fortpflanzung ohne Männchen.  
*Wissenschaft Fortschr.*, 13, 257 – 260.
- PETERS, G. (1971) Die intragenerischen Gruppen und die Phylogese der Schmetterlingsagamen ( *Agamidae :Leiolepis* ).  
*Zool. Jahrb.*, 98, 11 – 130.

- PETZOLDT, U., and HOPPE, P.C. (1980) Spontaneous parthenogenesis in *Mus musculus*: comparison of protein synthesis in parthenogenetic and normal preimplantation embryos.  
*Mol. Gen. Genet.*, 180, 547 – 552.
- PEYRON, A. (1938) Sur le développement, a l'intérieur des veins, dans les tumeurs a tissus multiples du testicule humain, d'embryons issus de parthénogénèse polyembryonique.  
*C. R. Acad. Sci.*, 207, 87 – 90.
- PEYRON, A. (1939) Faits nouveau relatifs a l'origine et a l'histogène'se des embryomes.  
*Bull. Assoc. Fr. Etude Cancer*, 28, 658 – 681.
- PEYRON, A. (1940 – A) La gastrulation dans les embryomes parthénogénétiques chez l'homme.  
*C. R. Soc. Biol.*, 134, 45 – 47.
- PEYRON, A. (1940 – B) Sur l'existence du canal neuren térique dans les boutons embryonnaires de la parthénogène'se tératologique du testicule chez l'homme.  
*C. R. Soc. Biol.*, 134, 446 – 448.
- PEYRON, A. (1940 – C) Sur la présence d'un tissu décidual'existence dans les embryomes testiculaires d'origine parthénogénétique.  
*D C. R. Soc. Biol.*, 134, 475 – 478.
- PEYRON, A. (1940 – D) Sur les variétés évolutives de la parthénogène'se tératologique dans l'ovaire des Mammiferes et leurs homologies avec celles des embryomes des glandes génitales.  
*C. R. Acad. Sci.*, 210, 61 – 63.
- PEYRON, A. (1940 – E) L'oeuf parthénogénétique de l'homme et ses analogies avec de certains singes.  
*C. R. Acad. Sci.*, 211, 81 – 83.
- PEYRON, A. (1940 – F) Sur les homologies général et et les caracte'res distinctifs des deux variatés gémellaires et parthénogénétique des embryomes.  
*C. R. Acad. Sci.*, 211, 164 – 166.
- PEYRON, A. (1940 – G) Sur les localisations et la mode de développement du tissu décidual dans les embryomes parthénogénétiques et les gestations extra – utérines.  
*C. R. Acad. Sci.*, 211, 812 – 814.

- PEYRON, A. (1941 – A) Sur les caractères morphologiques fondamentaux et leurs variations secondaires des boutons embryonnaires dans la parthénogénèse polyembryonnaire du testicule.  
*C. R. Soc. Biol.*, 135, 281 – 284.
- PEYRON, A. (1941 – B) Sur la présence dans les embryomes parthénogénétiques d'une variété de trophoblaste considérée jusqu'ici comme spéciale à l'oeuf de certains Primates.  
*C. R. Soc. Biol.*, 135, 757 – 760.
- PEYRON, A. (1941 – C) Sur un mode particulier de développement des boutons embryonnaires aux dépens des kystes blastuléens dans la parthénogénèse polyembryonnaire chez l'homme.  
*C. R. Soc. Biol.*, 135, 860 – 863.
- PEYRON, A. (1941 – D) Sur les caractères morphologiques et les tendances évolutives des néoformations issues du plancher des vésicules amnioectoblastiques au cours de la parthénogénèse polyembryonnaire.  
*C. R. Soc. Biol.*, 135, 864 – 866.
- PEYRON, A. (1941 – E) Sur la présence d'ébauches hépatiques dans les embryomes parthénogénétiques du testicule.  
*C. R. Soc. Biol.*, 135, 1305 – 1308.
- PEYRON, A. (1942) Sur les processus généraux de la blastogénèse dans les kystes blastuléens à membrane fertile, au cours de la parthénogénèse polyembryonnaire, chez l'homme.  
*C. R. Acad. Sci.*, 215, 229 – 231.
- PIERCE, G.B. (1967) Teratocarcinoma: model for a developmental concept of cancer.  
In: A. Monroy and A.A. Moscona, (Eds), *Current Topics in Developmental Biology*, 223 – 246. Academic Press, New York.
- PIERCE, G.B. (1975) Teratocarcinoma: introduction and perspectives.  
In: M.J. Sherman and D. Solter, (Eds), *Teratomas and Differentiation*, 3 – 12. Academic Press, New York.
- PIERCE, G.B., and DIXON, F.J. (1959) Testicular teratomas. I. Demonstration of teratogenesis by metamorphosis of multipotential cells.  
*Cancer*, 12, 573 – 583.
- PINCUS, G. (1930) Observations on the living eggs of the rabbit.  
*Proc. R. Soc. B.*, 107, 132 – 167.

- PLATT, R. and STRATTON, F. (1956) Ovarian agenesis with male skin sex. Evidence against parthenogenesis. *Lancet*, 1956 II, 120 – 121.
- POLICARD, A. (1913) A propos de parthénogénese humaine. *Arch. d'Anthropologie criminelle*, 28, 672 – 677.
- POOLE, H.K. (1959) The mitotic chromosomes of partheno genetic and normal turkeys. *J. Hered.*, 50, 151 – 154.
- POOLE, H.K. (1965) Further evidence of heterozygosity in Parthenogenetic Turkeys. *Nature*, 206, 324.
- POOLE, H.K., HEALY, W.V., RUSSELL, P.S. and OLSEN, M.W. (1963) Evidence of heterozygosity in parthenogenetic turkeys from homograft responses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 113, 503 – 505.
- POOLE, H.K. and OLSEN, M.W. (1957) The sex of parthenogenetic turkey embryos. *J. Hered.*, 48, 217 – 218.
- POOLE, H.K. and OLSEN, M.W. (1958) Incidence of parthenogenetic Development in Eggs Laid by Three Strains of Dark Cornish Chickens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 97, 477 – 478.
- POTTER, S.S., NEWBOLD, J.E., HUTCHINSON, C.A., and EDGELL, M.H. (1975) Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 4496 – 4500.
- POTTER, I.C. and ROBINSON, E.S. (1981) New developments in vertebrate cytotaxonomy V. Cytotaxonomy of lampreys. *Genetica*, 56, 149 – 151.
- POTTER, S.S., NEWBOLD, J.E., HUTCHINSON, C.A., and EDGELL, M.H. (1975) Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 4496 – 4500.
- PREHN, L.M. and RASH, E.M. (1969) Cytogenetic studies of *Poecilia* (Pisces) I. Chromosome numbers of naturally occurring poeciliid species and their hybrids from eastern Mexico. *Can. J. Genet. Cytol.*, 11, 880 – 895.

- PREVOST et DUMAS (1827) Mémoire sur le développement du Poulet dans l'oeuf.  
*Ann. Sci. Nat.*, t. XII, 415 – 443, pl. 47 – 54.
- PREVOST et DUMAS (1828) X. Prévost und Dumas über die Entwicklung des Hühnchens im Ei.  
*Z. org. Phys.*, St. 4, 427 – 438.
- PRELL, H. (1923) Der vererbungstheoretische Charakter der Parthenogenese.  
*Genetica*, Bd. 5, 191 – 208.
- QUINLAND, W.S., and St. HILL, I.R. (1947) Cystic teratoma (dermoid cysts) of the ovary. A study of fifty – two cases.  
*South Med. J.*, 40, 908 – 914.
- RABL, H. (1897) Zur Kenntnis der Richtungsspindel in degenerierten Säugetiereiern.  
*Sitzungsber. Wiener Akad.*, Bd 106, Abt. 3, 95.
- RABL, H. (1899) Ueber Atresie der Follikel und Bildung des Corpus luteum bei Menschen und Säugetieren.  
*Centralbl. Gynecol.*, Nr. 17, Bd. 23, 486 – 488.
- RASCH, E.M. (1968) Use of erythrocyte Deoxyribonucleric Acid – Feulgen levels as an index of triploids in naturally occurring interspecific hybrids of Poeciliid fishes.  
*J. Histochem. Cytochem.*, 16, 508 – 509.
- RASCH, E.M. and BALSANO, J.S. (1973) Cytogenetics of *Poecilia*. III. Persistence of triploid genomes in the progeny of unisexual females associated with *Poecilia formosa*.  
*Copeia*, 1973, 810 – 813.
- RASCH, E.M. and BALSANO, J.S. (1973) Biochemical and cytogenetic studies of *Poecilia* from Eastern Mexico. II. Frequency, perpetuation, and probable origin of triploid genomes in females associated with *Poecilia formosa*.  
*Rev. Biol. Trop.*, (San Josi), 21, 351 – 381.
- RASCH, E.M., DARNELL, R.M., KALLMAN, K.D. and ABRAMOFF, P. (1965) Cytophotometric evidence for triploidy in hybrids of the gynogenetic fish, *Poecilia formosa*.  
*J. Exp. Zool.*, 160, 155 – 170.
- RASCH, E.M., MONACO, P.J. and BALSANO, J.S. (1982) Cytophotometric

and autoradiographic evidence for functional apomixis in a gygogenetic fish, *Poecilia formosa* and its related, triploid unisexuals.  
*Histochemistry*, 73, 515 – 533.

RASCH, E.M., PREHN, L.M. and RASCH, R.W. (1970) Cytogenetic studies of *Poecilia* (Pisces). II. Triploidy and DNA levels in naturally occurring populations associated with the gynogenetic Teleost, *Poecilia formosa* (Girard).  
*Chromosoma*, 31, 18 – 40.

REAUMUR, R. – A.F. de (1737) Mémoires pour servir a l'Histoire des Insectes. Tome III, Paris.

REIMAN, S.P., and MILLER, B.J. (1939) Studies of human ova. I. Description of artificially induced parthenogenetic activities in one.  
*Arch. Pathol.*, 27, 412 – 418.

REIN, G. (1883) Beitrag zur Kenntnis der Reifungserscheinungen und Befruchtungsvorgänge am Säugetierei.  
*Arch. mikrosk. Anat.*, 22, 233 – 270.

RIGBY, C.C. (1968) Chromosome studies in ten testicular tumours.  
*Br. J. Cancer*, 22, 480 – 485.

ROBB, J. (1966) The generic status of the Australasian typhlopids (*Reptilia – Squamata*)  
*Ann. Mag. Nat. Hist.*, 13, 675 – 679.

ROOY, N. de, (1915) The reptiles of the Indo – Australian Archipelago. Vol. I. Lacertilia, Chelonia, Emydosauria.  
E.J. Brill, Leiden.

ROOY, N. de, (1917) The reptiles of the Indo – Australian archipelago. Vol. II. Ophidia.  
E.J. Brill, Leiden.

ROSTAND, J. (1938) La parthénogénese des Vertébrés.  
Hermann, Paris.

ROSTAND, J. (1950) La parthénogenese animale.  
Presses Universitaires de France, Paris, p. I – VII & 1 – 162.

ROSTAND, J. (1956) On the history of ideas relating to parthenogenesis in the human species.  
*Rev. Hist. Sci.*, 9, 221 – 235.

- RUBASCHKIN, W. (1906) Ueber die Veränderungen den Eier in den Zugrunde gehenden Graafschen Follikeln.  
*Anat. Hefte*, 32, 255 – 278.
- RUGE, H. (1958) Die Bestimmung der sogenannte Geschlechtschromosomen im Gewebe und im Leukozyten; ihre Bedeutung für die Einteilung der Intersexe und den Ursprung von Geschwülsten, insbesondere Teratomen.  
*Medizinische*, no 15, 642 – 653.
- SABRAZES, J., and PEYRON, A. (1940) Sur la reconstituon et la multiplication, dans les ganglions lymphatiques, des boutons embryonnaires de la parthénogenese polyembryonique.  
*C.R. Acad. Sci.*, 211, 341 – 343.
- SANSOM, G.S. (1920) Parthenogenesis in the water vole, *Microtus amphibius*.  
*J. Anat.*, 55, 68 – 77.
- SARVELLA, P. (1968) Parthenogenetic membranes in double-yolk and infected chicken eggs.  
*Proc. XII Int. Congr. Gen.*, 1, 165.
- SARVELLA, P. (1970 – A) Development of parthenogenesis in turkeys.  
*Genetics*, 64, S 56 (abstr.).
- SARVELLA, P. (1970 – B) Sporadic occurrence of parthenogenesis in poultry.  
*J. Hered.*, 61, 215 – 219.
- SARVELLA, P. (1971 – A) Development of parthenogenesis in chickens.  
*Poult. Sci.*, 50, 1626 (abstr.)
- SARVELLA, P. (1971 – B) Origin of Parthenogenesis in turkeys.  
*Genetics*, 68, S 57 – S 58 (abstr.)
- SARVELLA, P. (1971 – C) Frequency of parthenogenesis in chickens after insemination with irradiated sperm.  
*Radiat. Res.*, 46, 186 – 191.
- SARVELLA, P. (1972) Testis structure in normal and parthenogenetic turkeys.  
*Genetics*, 71, S 55 (abstr.).
- SARVELLA, P. (1973) Adult parthenogenetic Chickens.  
*Nature*, 243, 171.



- SARVELLA, P. (1974 – A) Testes structure in Normal and Parthenogenetic Turkeys.  
*J. Hered.*, 65, 287 – 290.
- SARVELLA, P. (1974 – B) Environmental Effects on a Parthenogenetic Line of Chickens.  
*Poult. Sci.*, 53, 273 – 279.
- SARVELLA, P. (1975) Multiple – Yolked Eggs from a Parthenogenetic Stock of Chickens.  
*Poult. Sci.*, 54, 1467 – 1471.
- SARVELLA, P. and GEHMAN, M. (1975) Development of Parthenogenetic Membranes in Double – yolked and Injected Chicken Eggs.  
*J. Exp. Zool.*, 192, 143 – 148.
- SASAKI, M. FUKUSCHIMA, T. and MAKIMO, S. (1962) Some aspects of chromosome constitution of hydatidiform moles and normal chorionic villi.  
*Gan*, 53, 101 – 106.
- SATO, I. and KOSIN, I.L. (1958) Chromosome complements in parthenogenetic turkey embryos.  
*Proc. Tenth Int. Congr. Gen.*, 2, 249 – 250. (abstract)
- SATO, I. and KOSIN, I.L. (1960 – A) A cytological study of the parthenogenetically developing turkey germ discs and embryos.  
*Cytologia (Tokyo)*, 25, 256 – 266.
- SATO, I. and KOSIN, I.L. (1960 – B) Chromosome complements in parthenogenetic turkey embryos.  
*Proc. Int. Congr. Genet.*, 10, 249 – 250. (Abstract)
- SAXEN, L. (1976) Review Article. Mechanisms of terato genesis.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 36, 1 – 12.
- SAXON, J.G. (1968) Sexual behavior of a male checkered whiptail lizard, *Cnemidophorus tesselatus* (Say).  
*Southwest Nat.*, 13, 454 – 455.
- SCHALL, J.J. (1976) Comparative ecology of sympatric parthenogenetic and bisexual species of *Cnemidophorus*.  
Ph.D. thesis, Univ. of Texas at Austin, 267 p.

- SCHALL, J.J. (1977 – A) Comparative ecology of sympatric parthenogenetic and bisexual species of *Cnemidophorus*.  
*Diss. Abstr. Int.*, 37, 3757 – 3758 – B.
- SCHALL, J.J. (1977 – B) Reproductive strategies in sympatric whiptail lizards (*Cnemidophorus*), two parthenogenetic and three bisexual species.  
*Copeia*, 1977, 108 – 116.
- SCHALL, J.J. (1977 – C) Thermal ecology of five sympatric *Cnemidophorus*.  
*Herpetologica*, 33, 261 – 272.
- SCHALL, J.J. (1978) Reproductive strategies in sympatric whiptail lizards (*Cnemidophorus*): two parthenogenetic and three bisexual species.  
*Copeia*, 1978, 108 – 116.
- SCHALL, J.J. (1981) Parthenogenetic lizards: r – selected reproductive characteristics.  
*Am. Nat.*, 117, 212 – 216.
- SCHÄPERCLAUS, W. (1953) Die Züchtung von Karauschen mit höchster Leistungsfähigkeit.  
*Z. Fisch.*, 2 N.F.
- SCHLAERTH, J.B., MORROW, C.P., KLETZKY, O.A., NALICK, R.H., and D'ABLAING, G.A. (1981) Prognostic characteristics of serum human chorionic gonadotropin titer regression following molar pregnancy.  
*Obstet. Gynecol.*, 58, 478 – 482.
- SCHMIDT, K.P. (1919) Herpetology of the Belgian Congo. Article II. Contributions to the herpetology of the Belgian Congo based on the collection of the American Museum Congo expedition, 1909 – 1915. Part I. Turtles, Crocodiles, Lizards, and Chameleons.  
*Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 39, 385 – 624.
- SCHOM, C.B., KRUGER, W.F. and ATKINSON, R.L. (1970) Incidence of parthenogenesis in a broad breasted white turkey flock.  
*Poult. Sci.*, 49, 1436.
- SCHOM, C.B., KRUGER, W.F. and ATKINSON, R.L. (1971) Parthenogenesis: genetic and environmental relationships in turkeys.  
*Poult. Sci.*, 50, 1628 – 1629 (Abstr.).
- SCHOM, C.B., KRUGER, W.F. and ATKINSON, R.L. (1972) Parthenogenesis, its incidence and heritability in the turkey.  
*Texas. J. Sci.*, 23, 580 (Abstr.).

- SCHOM, C.B., KRUGER, W.F. and ATKINSON, R.L. (1982) The relationship of parthenogenetic development in Broad Breasted White turkey eggs to level of production and environmental factors.  
*Poult Sci.*, 61, 2143 – 2148.
- SCHULTZ, M.E. and SCHULTZ, R.J. (1982 – A) Induction of hepatic tumors with 7,12 dimethylbenz(a) anthracene in 2 species of viviparous fishes genus *Poeciliopsis*  
*Environ Res.*, 27, 337 – 351.
- SCHULTZ, M.E. and SCHULTZ, R.J. (1982 – B) Di – ethyl nitrosamine induced hepatic tumors in wild vs. inbred strains of a viviparous fish *Poeciliopsis – lucida* .  
*J. Hered.*, 73, 43 – 48.
- SCHULTZ, R.J. (1961) Reproductive mechanism of uni sexual and bisexual strains of the viviparous fish *Poeciliopsis*.  
*Evolution*, 15, 302 – 325.
- SCHULTZ, R.J. (1966) Hybridization experiments with an all – female fish of the genus *Poeciliopsis*.  
*Biol. Bull.* (Woods Hole), 130, 415 – 429.
- SCHULTZ, R.J. (1967) Gynogenesis and triploidy in the viviparous fish *Poeciliopsis*.  
*Science* , 157, 1564 – 1567.
- SCHULTZ, R.J. (1969) Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis (Poeciliidae)* and other vertebrates.  
*Am. Nat.*, 103, 605 – 619.
- SCHULTZ, R.J. (1971) Special adaptive problems associated with unisexual fishes.  
*Am. Zool.*, 11, 351 – 360.
- SCHULTZ, R.J. (1973 – A) Unisexual fish: laboratory synthesis of a 'species'.  
*Science*, 179, 180 – 181.
- SCHULTZ, R.J. (1973 – B) Origin and synthesis of a unisexual fish.  
In : J.H. Schöder (ed), *Genetics and Mutagenesis of Fish*. Springer – Verlag, Berlin.

- SCHULTZ, R.J. (1977) Evolution and ecology of unisexual fishes.  
*Evol. Biol.*, 10, 277 – 331.
- SCHULTZ, R.J. (1979) Role of polyploidy in the evolution of fishes.  
*Basic Life Sci.*, 13, 313 – 340.
- SCHULTZ, R.J. and ANGUS, R.A. (1980) Unisexual species of vertebrates origins genetic variation and adaptive success.  
In: The University of British Columbia, Second International Congress of systematic and evolutionary biology, Vancouver, B.C., Canada, July 17 – 24, 1980, 101.
- SCHULTZ, R.J. and KALLMAN, K.D. (1968) Triploid hybrids between the all – female teleost *Poecilia formosa* and *Poecilia sphenops*.  
*Nature*, 219, 280 – 282.
- SCHULTZ, R.J. and MILLER, R.R. (1971) Species of the *Poecilia sphenops* complex (*Pisces: Poeciliidae*) in Mexico.  
*Copeia*, 1971, 282 – 290.
- SCUDDAY, J. (1971) The biogeography and some ecological aspects of the teiid lizards ( *Cnemidophorus*) of Trans – Pecos Texas.  
Ph.D. thesis, Texas A & M University.
- SCUDDAY, J.F. (1973) A new species of lizard of the *Cnemidophorus tessellatus* group from Texas.  
*J. Herpetol.*, 7, 363 – 371.
- SCULLY, R.E. (1977) Ovarian tumors: A review.  
*Am. J. Pathol.*, 87, 686 – 720.
- SERENA, M.L. (1980) Sex and the single lizard: the origin and evolution of parthenogenetic *Cnemidophorus lemniscatus* in Surinam.  
Ph.D. thesis, Univ. of Colorado at Boulder, 264 p.
- SERENA, M.L. (1981) Sex and the single lizard: the origin and evolution of parthenogenetic *Cnemidophorus lemniscatus* in Surinam.  
*Diss. Abstr. Int.*, 41, 2868 – B.
- SESSIONS, S.K. (1982) Cytogenetics of diploid and triploid salamanders of the *Ambystoma jeffersonianum* complex.  
*Chromosoma* (Berl), 84, 599 – 622.
- SEZAKI, K., KOBAYASI, H. and NAKAMURA, M. (1977) Size of the

- erythrocytes in the diploid and triploid specimens of *Carassius auratus langsdorffii*.  
*Jpn. J. Ichthyol.*, 24, 135 – 140.
- SHCHETININA, L.A. (1956) On the Reproduction of the Prussian carp in the Veselovsk Water Reservoir.  
*Zool. J.*, 35, 10.
- SHERMAN, M.I., and SOLTER, D. (1975) Teratomas and Differentiation.  
Academic Press, New York.
- SHETTLES, L.B. (1953) Observations on human follicular and tubal ova.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 66, 235 – 247.
- SHIMANSKII, A.M. (1969) Comparative Analysis of variability in bisexual and parthenogenetic populations of rock lizards of the Caucasus subgenus *Archaeolacerta*.  
*Zh. Obshch. Biol.*, 30, 561 – 571.
- SHIMANSKII, A.M. (1970) Analysis of variability in some bisexual, parthenogenetic, and hybrid forms of Caucasian rock lizards.  
Thesis, Univ. of Leningrad.
- SHINOHARA, T., SASAKI, M.S. and TONOMURA, A. (1971) Cytogenetic studies in human chorionic lesions.  
*Jpn. J. Hum. Genet.*, 16, 111 – 112.
- SIEBOLD, C.T.E. von (1856) Wahre Parthenogenesis bei Schmetterlingen und Bienen.  
Leipzig. (English translation by W.S. Dallas (1857). On a True Parthenogenesis in Moths and Bees; a Contribution to the History of Reproduction in Animals. John van Voorst, London.)
- SILVERMAN, M.M., and ALBAN, E.J. (1952) Cystic teratomas: a review of eighty – two cases.  
*J. Int. Coll. Surg.*, 18, 61 – 68.
- SIMANEK, D.E. (1978) Population genetics and evolution in the *Poecilia formosa* complex. (Pisces: Poeciliidae).  
Ph. D. Thesis, Yale Univ., 229 p.
- SIMARD, L.C. (1957) Polyembryonic embryoma of the ovary of parthenogenetic origin.  
*Cancer*, 10, 215 – 223.

- SINOSICH, M.J., TEISNER, B., FOLKERSEN, J., SAUNDERS, D.M., and GRUDZINSKAS, J.G. (1982) Radioimmunoassay for pregnancy – associated plasma protein A.  
*Clin. Chem.*, 28, 50 – 53.
- SLYE, M., HOLMES, H.F., and WELLS, H.G. (1920) Primary spontaneous tumors of the ovary in mice. Studies on the incidence and inheritability of spontaneous tumors in mice.  
*J. Cancer Res.*, 5, 205 – 226.
- SMITH, G.V.S. (1929) Proliferative ovarian tumors. A clinical and pathological study of 435 cases treated between 1875 and 1928 at the Clinic of the Free Hospital for Women.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 18, 666 – 682.
- SMITH, H.M. (1963) Request for extension and consolidation of the first – reviser on principle in revision of the 1961 Code.  
*Bull. Zool. Nomencl.*, 20, 49 – 50.
- SMITH, H.M. (1973) A tentative rearrangement of the lizards of the genus *Lepidophyma*.  
*J. Herpetol.*, 7, 109 – 123.
- SMITH, H.M. and TAYLOR, E.H. (1950) An annotated check list and key to the reptiles of Mexico exclusive of the snakes.  
*U.S. Nat. Mus. Bull.*, 199, 1 – 253.
- SMITH, M.A. (1935) The fauna of British India, including Ceylon and Burma. In : R.B.S. Sewell ( Ed ), *Reptilia and Amphibia*, Vol II – *Sauria*, Taylor and Francis, London.
- SMITH, M.A. (1949) The edible frog and the marsh frog in England.  
*Zoo Life*, No. 2.
- SMITH, S.C. (1925) Degenerative changes in unfertilized uterine eggs of opossum with remarks on so called parthenogenesis in mammals.  
*Am. J. Anat.*, 35, 81 – 103.
- SMITHELLS, R.W. (1980) The challenges of teratology.  
*Teratology*, 22, 77 – 85.
- SOLA, L., CATAUDELLA, S. and CAPANNA, E. ( 1981) New developments in vertebrate cytotaxonomy. III. Karyology of bony fishes: A review.  
*Genetica*, 54, 285 – 328.

- SPEMANN, H. (1918) Ueber die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryo.  
*Arch. Entwicklungsmech. Organ.*, 43, 448 – 555.
- SPINELLA, D.G. and VRIJENHOEK, R.C. (1982) Genetic dissection of clonally inherited genomes of *Poeciliopsis* : II. Investigation of a silent carboxylesterase allele.  
*Genetics*, 100, 279 – 286.
- SPIRO, M.E. (1968) Virgin birth parthenogenesis and physiological paternity. An essay in cultural interpretation.  
*Man*, 3, 242 – 261.
- SPULER, A. (1901) Ueber die Teilungserscheinungen der Eizellen in degenerierenden Follikeln. Mitosen unreifer Eizellen; Richtungskörperchenbildung; Mitosen parthenogenetischer Entwicklung.  
*Anat. Hefte*, Nr. 50.
- SPURWAY, H. (1953) Spontaneous parthenogenesis in a fish.  
*Nature*, 171, 437.
- SPURWAY, H. (1957) Hermaphroditism with self-fertilization, and the monthly extrusion of unfertilized eggs, in the viviparous fish *Lebistes reticulatus*.  
*Nature*, 180, 1248 – 1251.
- STALKER, H.D. (1954) Parthenogenesis in *Drosophila*.  
*Genetics*, 39, 4 – 34.
- STANHOPE, C.R., STUART, G.C. and CURTIS, K.L. (1983) Primary ovarian hydatidiform mole: review of the literature and report of a case.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 145, 886 – 888.
- STATOVA, M.P. (1963) On (the) reproduction of the silver carp in the ponds of Moldavia.  
*Izv. An. Moldavsk. SSR*, 5, 49 (in Russian).
- STERNFELD. (1912)  
*Wiss. Ergeb. Dtsch. Zent. Afrika Exped.*, IV, 262.
- STEVENS, L.C. (1957) A description of spontaneous congenital testicular teratomas in strain 129 mice.  
*J. Natl. Cancer Inst.*, 18, 719 – 747.

- STEVENS, L.C. (1958) Studies on transplantable testicular teratomas of strain 129 mice.  
*J. Natl. Cancer Inst.* , 20, 1257 – 1276.
- STEVENS, L.C. (1959) Embryology of testicular teratomas in strain 129 mice.  
*J. Natl. Cancer Inst.* , 23, 1249 – 1295.
- STEVENS, L.C. (1962) Testicular teratomas in fetal mice.  
*J. Natl. Cancer Inst.* , 28, 247 – 268.
- STEVENS, L.C. (1964) Experimental production of testicular teratomas in mice.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 52, 654 – 661.
- STEVENS, L.C. (1967 – A) The biology of teratomas.  
*Adv. Morphol.* , 6, 1 – 31.
- STEVENS, L.C. (1967 – B) Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice.  
*J. Natl. Cancer Inst.* , 38, 549 – 552.
- STEVENS, L.C. (1968) The development of teratomas from intratesticular grafts of tubal mouse eggs.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.* , 20, 329 – 341.
- STEVENS, L.C. (1970 – A) The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre – and postimplantation mouse embryos.  
*Dev. Biol.* , 21, 364 – 382.
- STEVENS, L.C. (1970 – B) Experimental production of testicular teratomas in mice of strains 129, A/He, and their F1 hybrids.  
*J. Natl. Cancer Inst.* , 44, 923 – 929.
- STEVENS, L.C. (1973) A new inbred subline of mice (129/terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas  
*J. Natl. Cancer Inst.* , 50, 235 – 242.
- STEVENS, L.C. (1975 – A) Comparative Development of Normal and Parthenogenetic Mouse Embryos, Early Testicular and Ovarian Teratomas, and Embryoid Bodies.  
In: M.J. Sherman and D. Solter (Eds), *Teratomas and Differentiation*, 17 – 32, Academic Press, N.Y.



- STEVENS, L.C. (1975 – B) Teratocarcinogenesis and spontaneous parthenogenesis in mice.  
In: C.L. Markert and J. Papaconstantinou, (Eds), *The Developmental Biology of Reproduction*, 33rd Symp. Soc. Dev. Biol., 93 – 106, Academic Press, New York.
- STEVENS, L.C. (1976) Animal Model: Ovarian Tumors in Inbred Strain LT/Sv Mice.  
*Am. J. Pathol.*, 85, 809 – 811.
- STEVENS, L.C. (1978) Totipotent cells of parthenogenetic origin in a chimaeric mouse.  
*Nature*, 276, 266 – 267.
- STEVENS, L.C. (1980) Teratogenesis and spontaneous parthenogenesis in mice.  
*Results Probl. Cell Differ.*, 11, 265 – 274.
- STEVENS, L.C. (1981) Genetic influences on teratocarcinogenesis and parthenogenesis.  
*Prog. Clin. Biol. Res.*, 45, 93 – 104.
- STEVENS, L.C. and PIERCE, G.B. (1975) Teratomas: Definitions and Terminology.  
In: M.J. Sherman and D. Solter (Eds), *Teratomas and Differentiation*, 13 – 16, Academic Press, N.Y.
- STEVENS, L.C. and VARNUM, D.S. (1974) The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs.  
*Dev. Biol.*, 37, 369 – 380.
- STEWART, C.L. (1982) Formation of viable chimaeras by aggregation between teratocarcinomas and preimplantation mouse embryos.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 67, 167 – 179.
- STOLK, A. (1958) Pathological parthenogenesis in viviparous toothcarps.  
*Nature*, 181, 1660.
- STOLK, A. (1961) Pathological parthenogenesis in a viviparous toothcarp.  
*Nature*, 191, 507.
- STONE, M., and BAGSHAW, K.D. (1976) Hydatiform mole: Two entities.  
*Lancet*, 1976 I, 535 – 536.

- STORR, G.M. (1968) First australian record of the asian blind – snake *Typhlops braminus*  
*J. Herpetol.*, 1, 98.
- STRASSMAN, E.O. (1949) Parthenogenic development of the ovum as observed by vital staining.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 58, 237 – 244.
- STROMMEN, C.A., RASH, E.M. and BALSANO, J.S. (1975 – A) Cytogenetic studies of *Poecilia formosa* (Pisces) IV. Epithelial cell biopses to identify triploid females associated with *Poecilia formosa*.  
*Copeia*, 1975, 568 – 572.
- STROMMEN, C.A., RASCH, E.M. and BALSANO, J.S. (1975) Cytogenetic studies of *Poecilia (Pisces)* V. Cytophotometric evidence for the production of fertile offspring by triploids related to *Poecilia formosa*.  
*J. Fish Biol.*, 7, 667 – 676.
- STUNSON, A.F., ROBB, J., and UNDERWOOD, G. (1977) *Leptotyphlops* and *Ramphotyphlops* Fitzinger, 1843, (Reptilia, Serpentes): proposed conservation under the plenary powers. Z. N. (S.) 2155.  
*Bull. Zool. Nomencl.*, 33, 204 – 207.
- SUKHANOVA, A.J. (1972) About the development of non – impregnated roe of herbivorous fishes.  
*Izv. Akad. Nauk. Turkmenskoi S.S.R., Ser. Biol.* 3, 86 – 88. (in Russian, English summary).
- SUOMALAINEN, E. (1950) Parthenogenesis in animals.  
*Adv. Genet.*, 3, 193 – 253.
- SUOMALAINEN, E. (1958) On polyploidy in Animals.  
*Proc. Finn. Acad. Sci. Lett.*, 1958, 105 – 119.
- SURTI, U., SZULMAN, A.E. and O'BRIEN, S. (1979) Complete (classic) hydatidiform mole with 46, XY karyotype of paternal origin.  
*Humangenetik*, 51, 153 – 156.
- SURTI, U., SZULMAN, A.E. and O'BRIEN, S. (1982) Dispermic origin and clinical outcome of three complete hydatidiform moles with 46,XY karyotype.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 144, 84 – 87.
- SZOLLOSI, D. (1975) Mammalian eggs aging in the fallopian tubes.

In: R.J. Blandau, (Ed), Aging Gametes, 98 – 121. International symposium on Aging Gametes, Seattle, 1973. Karger, Basel.

SZULMAN, A.E., PHILIPPE, E., BOUE, J.G., and BOUE, A. (1981) Human triploidy: association with partial hydatidiform moles and nonmolar conceptuses.  
*Hum. Pathol.*, 12, 1016 – 1021.

SZULMAN, A.E. and SURTI, U. (1978 – A) The syndromes of hydatidiform mole. I. Cytogenetic and morphologic correlations.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 131, 665 – 671.

SZULMAN, A.E. and SURTI, U. (1978 – B) The syndromes of hydatidiform mole. II. Morphologic evolution of the complete and partial mole.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 132, 20 – 27.

SZULMAN, A.E., and SURTI, U. (1982) The clinicopathologic profile of the partial hydatidiform mole.  
*Obstet. Gynecol.*, 59, 597 – 602.

TAYLOR, A.I. (1963) Nuclear sex of embryonic tumours.  
*Br. Med. J.*, 1, 377 – 378.

TAYLOR, E.H. (1921) Amphibians and turtles of the Philippine Islands.  
Dept. of Agriculture and Natural Resources Bureau of Science, Bureau of Printing, Publication No. 15, Manilla.

TAYLOR, E.H. (1922) The lizards of the Philippine Islands.  
Dept. of Agriculture and Natural Resources Bureau of Science, Bureau of Printing, Manilla.

TAYLOR, E.H. (1963) The lizards of Thailand.  
*Univ. Kans. Sci. Bull.*, 44, 687 – 1077.

TAYLOR, H.L. (1965) Morphological variation in selected populations of the teiid lizards *Cnemidophorus velox* and *Cnemidophorus inornatus*.  
*Univ. Colo. Stud. Ser. Biol.*, No.21, 27 pp.

TAYLOR, H.L. and MEDICA, P.A. (1966) Natural hybridization of the bisexual teiid lizard *Cnemidophorus inornatus* and the unisexual *C. perplexus* in Southern New Mexico.  
*Univ. Colo. Stud. Ser. Biol.*, No.22, 9pp.

TAYLOR, H.L., WALTER, J.M. and MEDICA, P.A. (1967) Males of three

normally parthenogenetic species of teiid lizards (genus *Cnemidophorus*).  
*Copeia*, 1967, 737 – 743.

- TAYLOR, R.A.J. (1981) The behavioral basis of re – distribution. 2. Simulations of the delta model.  
*J. Anim. Ecol.*, 50, 587 – 604.
- TCHOU – SU (1936) L'Hybridation chez les anoues de Canton (Chine).  
*C.R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, 202, 242 – 244.
- TELFORD, S.R. and CAMPBELL, H.W. (1970) Ecological observations on an all – female population of the lizard *Lepidophyma flavimaculatum* (*Xantusiidae*) in Panama.  
*Copeia*, 1970, 379 – 381.
- TEMPLETON, A.R. (1972) Statistical models of parthenogenesis.  
Ph.D. thesis, Univ. of Michigan, 140 p.
- TEMPLETON, A.R. (1973) Statistical models of parthenogenesis.  
*Diss. Abstr. Int.*, 33, 5164 – B.
- TEMPLETON, A.R. (1974) Density Dependent Selection in Parthenogenetic and Self – Mating Populations.  
*Theor. Popul. Biol.*, 5, 229 – 250.
- THAN, G.N., BOHN, H., CSABA, I.F., SZABO, D.G., KARG, N.J., and GOECZE, P. (1981) Placental proteins (SP1, hCG, PP5) and alpha 2 – PAG in trophoblastic diseases.  
*Arch. Gynecol.*, 231, 33 – 39.
- THEIS, E.A., ASHLEY, D.J.B. and MOSTOFI, F.K. (1960) Nuclear sex of testicular tumors and some related ovarian and extragonadal neoplasms.  
*Cancer*, 13, 323 – 327.
- THIBAUT, C. (1949) L'oeuf des mammiferes, son développement parthénogénétique.  
*Ann. Sci. Nat. Zool.*, 11, 133 – 219.
- THIBAUT, R.E. (1974 – A) The ecology of unisexual and bisexual fishes of the genus *Poeciliopsis*: a study in niche relationships.  
Ph.D. thesis, Univ. of Connecticut, Storrs.
- THIBAUT, R.E. (1974 – B) Genetics of cannibalism in viviparous fish and its relationship to population density.  
*Nature*, 251, 138 – 140.

- THIBAULT, R.E. (1978) Ecological and evolutionary relationships among diploid and triploid unisexual fishes associated with the bisexual species *Poeciliopsis - lucida* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Evolution*, 32, 613 – 623.
- THIBAULT, R.E. and SCHULTZ, R.J. (1978) Reproductive adaptations among viviparous fishes. ( *Cyprinodontiformes : Poeciliidae*). *Evolution*, 32, 320 – 333.
- THIERY, M. (1963) Ovarian teratomas in the mouse. *Br. J. Cancer*, 17, 231 – 234.
- THOMAS, R. (1965) The smaller teiid lizards ( *Gymnophthalmus* and *Bachia*) of the Southeastern Caribbean. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 78, 141 – 145.
- THOMSEN, M. (1927) Studien über die Parthenogenese bei einigen Cocciden und Aleurodiden. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 5, 1 – 116.
- TINKLE, D.W. (1959) Observations on the lizards *Cnemidophorus tigris*, *Cnemidophorus tessellatus* and *Crotaphytus wislizeni*. *Southwest. Nat.*, 4, 195 – 200.
- TOWNSEND, C.R. (1979) Establishment and maintenance of colonies of parthenogenetic whiptail lizards ( *Cnemidophorus* spp.) *Int. Zoo Yearb.*, 19, 80 – 86.
- TRIFONOWA, A. (1931) Zur Frage der Parthenogenese und Hybridization der Fische. (Vorläufige Mitteilung.) *Zool. Anz.*, 96, 193 – 198.
- TRIFONOWA, A. (1934) Parthenogenese der Fische. *Acta Zool. (Stockh.)*, 15, 183 – 213.
- TROTTIER, T.M. (1976) Diploid gynogenesis in the Mexican Axolotl. *Genetics*, 83, 783 – 792.
- TUNNER, H.G. (1970) Das Serumeiweißbild einheimischer Wasserfrösche und der Hybridcharakter von *Rana esculenta*. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, 64, 352 – 358.

- TUNNER, H.G. (1972) Serologische und morphologische Untersuchungen zur Frage der Artabgrenzung bei Wasserfröschen aus der Umgebung von Mainz (Rhein – Main – Gebiet).  
*Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.*, 10, 127 – 132.
- TUNNER, H.G. (1973 – A) Das Albumin und andere Bluteiweiße bei *Rana ridibunda* Pallas, *Rana lessonae* Camerano, *Rana esculenta* Linné und deren Hybriden.  
*Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.*, 11, 219 – 233.
- TUNNER, H.G. (1973 – B) Demonstration of the hybrid origin of the common frog *Rana esculenta* L.  
*Naturwissenschaften*, 60, 481 – 482.
- TUNNER, H.G. (1974) Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation.  
*Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.*, 12 309 – 314.
- TUNNER, H.G. and DOBROWSKI, M. – Th. (1976) Zur morphologischen, serologischen und enzymologischen Differenzierung von *Rana lessonae* und der hybridogenetischen *Rana esculenta* aus dem Seewinkel und dem Neusiedlersee (Oesterreich, Burgenland).  
*Zool. Anz.*, 197, 6 – 22.
- TUNNER, H.G. and UZZELL, T. (1974) Das Serumalbumin bei *Rana ridibunda perezii* (Salientia, Ranidae).  
*Salamandra*, 10, 137 – 139.
- TURNER, B.J., BRETT, B. – L.H., and MILLER, R.R. (1980 – A) Evolutionary genetics of a gynogenetic fish, *Poecilia formosa*, the Amazon molly.  
*Evolution*, 34, 246 – 258.
- TURNER, B.J., BRETT, B – L.H. and MILLER, R.R. (1980 – B) Interspecific hybridization and the evolutionary origin of a gynogenetic fish *Poecilia –formosa*.  
*Evolution*, 34, 917 – 922.
- TURNER, B.J., BRETT, B – L.H., RASCH, E.M. and BALSANO, J.S. (1980) Evolutionary genetics of a gynogenetic fish *Poecilia –formosa*, the amazon molly.  
*Evolution*, 34, 246 – 258.
- TURDAKOV, F.A. and TURDAKOV, A.F. (1959) Parthenogenesis and other characteristics of *Leuciscus bergi* development.  
*Izv. Akad. Nauk. Kirgizskoi S.S.R., Ser. Biol.*, 1, No. 4, 3 – 44. (in Russian).

- UZZELL, T.M., Jr. (1963) Natural Triploidy in salamanders related to *Ambystoma jeffersonianum*.  
*Science*, 139, 113 – 115.
- UZZELL, T.M., Jr. (1964) Relations of the diploid and triploid species of the *Ambystoma jeffersonianum* complex (*Amphibia*, *Caudata*).  
*Copeia*, 257 – 300.
- UZZELL, T.M., Jr. (1970) Meiotic mechanisms of naturally occurring unisexual vertebrates.  
*Am. Nat.*, 104, 433 – 445.
- UZZELL, T.M., Jr. (1972) Hybrid origin of unisexual lizards, genus *Lacerta*.  
*Am. Philos. Soc. Yearb.*, 1972, 401 – 402.
- UZZELL, T.M., Jr. and BARRY, J.C. (1971) *Leposoma percarinatum*, a unisexual species related to *L. guianense*; and *Leposoma ioanna*, a new species from Pacific coastal Colombia ( *Sauria*, *Teiidae* ).  
*Postilla*, 154, 1 – 39.
- UZZELL, T.M., Jr. and BERGER, L. (1975) Electrophoretic phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, and their hybridogenetic associate, *Rana esculenta*.  
*Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia*, 127, 13 – 24.
- UZZELL, T.M., Jr., BERGER, L. and GUNTHER, R. (1975) Diploid and triploid progeny from a diploid female of *Rana esculenta* (*Amphibia*, *Salienta*).  
*Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia*,
- UZZELL, T.M., Jr. and DAREVSKY, I.S. (1972) Biochemical and evolutionary studies of unisexual and bisexual lizards of the *Lacerta saxicola* complex. In: Theme No. 5: Études moléculaires des différences entre les espèces. *Proc. 17th Int. Congr. Zool.*, Monte – Carlo, 25 – 30 Sept. 1972.
- UZZELL, T.M., Jr. and DAREVSKY, I.S. (1973 – A) The relationships of *Lacerta portschinskii* and *Lacerta raddei* (*Sauria*, *Lacertidae*).  
*Herpetologica*, 29, 1 – 6.
- UZZELL, T.M., Jr. and DAREVSKY, I.S. (1973 – B) Electrophoretic examination of *Lacerta mixta*, a possible hybrid species (*Sauria*, *Lacertidae*).  
*J. Herpetol.*, 7, 11 – 15.

- UZZELL, T.M., Jr. and DAREVSKY, I.S. (1974) Proofs of hybrid origin of parthenogenetic species of the Caucasian rock lizards of the genus *Lacerta*. *Zh. Obshch. Biol.*, 35, 553 – 561. (Russian, English summary).
- UZZELL, T.M., Jr. and DAREVSKY, I.S. (1975) Biochemical evidence for the hybrid origin of the parthenogenetic species of the *Lacerta saxicola* complex ( *Sauria:Lacertidae*) with a discussion of some ecological and evolutionary implications. *Copeia*, 1975 – II, 204 – 222.
- UZZELL, T.M., Jr. and GOLDBLATT, S.M. (1967) Serum proteins of salamanders of the *Ambystoma jeffersonianum* complex, and the origin of the triploid species of this group. *Evolution*, 21, 345 – 354.
- VANDEL, A. (1927) La cytologie de la parthénogénèse naturelle. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 61, 93 – 125.
- VANDEL, A. (1928) La parthénogénèse géographique. Contribution a l'étude biologique et cytologique de la parthénogénèse naturelle. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 62, 164 – 281.
- VANDEL, A. (1931) La Parthénogénèse. G. Doin & Cie. (Eds), Paris.
- VANDEL, A. (1936) L'évolution de la parthénogénèse naturelle. *C.R. XII Congr. Int. Zool.*, 1, 51 – 64.
- VANDEL, A. (1937) Chromosome number, polyploidy, and sex in the animal kingdom. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 107A, 519 – 541.
- VAN DENBURGH, J. (1896) A list of some reptiles from Southeastern Arizona, with a description of a new species of *Cnemidophorus*. *Proc. Calif. Acad. Sci.*, ser. 2, 6, 338 – 349.
- VAN DENBURGH, J. (1922) The reptiles of Western North America. An account of the species known to inhabit California and Oregon, Washington, Idaho, Utah, Nevada, Arizona, British Colombia, Sonora and Lower California. *Occas. Pap. Calif. Acad. Sci.*, 10, 1 – 611.
- VANZOLINI, P.E. (1970) Unisexual *Cnemidophorus lemniscatus* in the Amazonas valley: a preliminary note ( *Sauria:Teiidae*). *Pap. Avulsos Zool.*, (Sao Paulo), 23, 63 – 68.



- VANZOLINI, P.E., (1978) Parthenogenetic Lizards (Part I).  
*Science*, 201, 1152. (Also see Part II: Wright, J.W.; Part III: Cole, C.J.; and  
 Part IV: Cuellar, O.)
- VASSILAKOS, P., RIOTTON, G. & KAJII, T. (1977) Hydatidiform mole: Two  
 entities.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 127, 167 – 170.
- VOGEL, P. and CHEN, P.S. (1976) Genetic control of LDH isozymes in the  
*Rana esculenta* complex.  
*Experientia*, 32, 304 – 307.
- VRIJENHOEK, R.C. (1972 – A) Genetic relations of unisexual – hybrid fishes  
 to their progenitors using lactate hydrogenase isozymes as gene markers  
 (*Poeciliopsis*, *Poeciliidae* ).  
*Am. Nat.*, 106, 754 – 766.
- VRIJENHOEK, R.C. (1972 – B) Hybrid relationships of diploid and triploid  
 forms of *Poeciliopsis* (*Pisces* : *Poeciliidae*).  
 Ph.D. thesis, Univ. of Connecticut, Storrs.
- VRIJENHOEK, R.C. (1975) Gene dosage in diploid and triploid unisexual  
 fishes.  
 In: C.L. Markert, (Ed), *Isozymes*, Vol. 4: Genetics and Evolution, 463 – 475,  
 Academic Press, New York.
- VRIJENHOEK, R.C. (1978 – A) Coexistence of clones in a heterogeneous  
 environment.  
*Science*, 199:549 – 552.
- VRIJENHOEK, R.C. (1978 – B) Evolutionary Genetics of clonally reproducing  
 fish.  
*Can. J. Genet. Cytol.*, 20, 457.
- VRIJENHOEK, R.C. (1979 – A) Factors affecting clonal diversity and  
 coexistence.  
*Am. Zool.*, 19, 787 – 798.
- VRIJENHOEK, R.C. (1979 – B) Genetics of a sexually reproducing fish in a  
 highly fluctuating environment.  
*Am. Nat.*, 113, 17 – 30.

- VRIJENHOEK, R.C. (1980) Accumulation of lethal and silencing mutations in clonally inherited genomes of diploid and triploid fish.  
In: The University of British Columbia. Second International Congress of systematic and evolutionary biology, Vancouver, B.C., Canada, July 17 – 24, 1980, 97.
- VRIJENHOEK, R.C., ANGUS, R., and SCHULTZ, R.J. (1976) Variation and clonal structure in a unisexual fish.  
*Isozyme Bull.*, 9, 60.
- VRIJENHOEK, R.C., ANGUS, R.A. and SCHULTZ, R.J. (1977) Variation and heterozygosity in sexually vs. clonally reproducing population of *Poeciliopsis*.  
*Evolution*, 31, 767 – 781.
- VRIJENHOEK, R.C., ANGUS, R.A. and SCHULTZ, R.J. (1978) Variation and clonal structure in a unisexual fish.  
*Am. Nat.*, 112, 41 – 55.
- VRIJENHOEK, R.C. and LERMAN, S. (1982) Heterozygosity and developmental stability under sexual and asexual breeding systems.  
*Evolution*, 36, 768 – 776.
- VRIJENHOEK, R.C. and SCHULTZ, R.J. (1974) Evolution of a trihybrid unisexual fish (*Poeciliopsis*, *Poeciliidae*).  
*Evolution*, 28, 306 – 319.
- WAKE, N., TAKAGI, N. and SASAKI, M. (1978) Androgenesis as a cause of hydatidiform mole.  
*J. Natl. Cancer Inst.*, 60, 51 – 57.
- WALDEYER, W. (1870) Die epithelialen Eierstocksgeschwülste, insbesondere die Kystome.  
*Arch. Gynaekol.*, Bd I, Hft 2, 252 – 316.
- WALDEYER, W. (1872) Ueber mehrfache indirekte Kernteilung.  
*Arch. Pathol. Anat.*, 55, 132 – 148.
- WALLACE, D.C., SURTI, U., ADAMS, C.W. and SZULMAN, A.E. (1982) Complete moles have paternal chromosomes but maternal mitochondrial DNA.  
*Hum. Genet.*, 61, 145 – 147.
- WEINMANN, J.P. MEYER, J. and MARWAH, A.S. (1955) Absence of

chromosomal sex differences in epidermal structures of basal cell carcinoma.

*J. Invest. Dermatol.*, 25, 43 – 54.

WERNER, Y.L. (1981) Apparent homosexual behavior in an all-female population of a lizard, *Lepidodactylus lugubris* and its probable interpretation.

*Z. Tierpsychol.*, 54, 144 – 150.

WHITE, M.J.D. (1968) Models of speciation.

*Science*, 159, 1065 – 1070.

WHITE, M.J.D. (1970) Heterozygosity and Genetic polymorphism in Parthenogenetic Animals.

In: M.K. Hecht and W.C. Steere (Eds), *Essays in Evolution and Genetics in honor of Theodosius Dobzhansky*, Chapter 8, 237 – 262, Appleton, Century, Crofts; New York.

WHITE, M.J.D. (1978) Modes of speciation, 455 p.

W.H. Freeman, San Francisco.

WHITE, M.J.D. (1973) Animal cytology and evolution.

Cambridge University Press, London, 682 – 758.

WHITING, P.W. (1945) The evolution of male haploidy.

*Q. Rev. Biol.*, 20, 231 – 260.

WHITTEN, W.K. (1971) Parthenogenesis: does it occur spontaneously in mice?

*Science*, 171, 406 – 407.

WILBUR, M.H. (1971) The ecological relationship of the salamander *Ambystoma laterale* to its all-female, gynogenetic associate.

*Evolution*, 25, 168 – 179.

WILLIS, R.A. (1953) Pathology of tumours.

2nd. ed. Butterworth, London

WILLIS, R.A. (1954) Teratomas.

In: *Atlas of Tumor Pathology* (Section III – Fascicle 9). Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology.

WILLIS, R.A. (1967) The Pathology of Tumours (4th ed.).

Butterworth, London.

- WINKLER, H. (1908)  
*Progr. Rei Bot.*, 2, 293 – 454.
- WINKLER, H. (1920) Verbreitung und Ursache der Parthenogenesis im Pflanzen – und Tierreiche.  
 Verlag Fischer, Jena.
- WOODHEAD, A.D. and SCULLY, P.M. (1977) A comparative study of the pretumorous thyroid gland of the gynogenetic teleost, *Poecilia formosa*, and that of other poeciliid fishes.  
*Cancer Res.*, 37, 3751 – 3755.
- WRIGHT, J.W. (1966) Variation in two sympatric whiptail lizards (*Cnemidophorus inornatus* and *C. velox*) in New Mexico.  
*Southwest Nat.*, 11, 54 – 71.
- WRIGHT, J.W. (1967) A new uniparental whiptail lizard (genus *Cnemidophorus*) from Sonora, Mexico.  
*J. Ariz. Acad. Sci.*, 4, 185 – 193.
- WRIGHT, J.W. (1968) Variation in three sympatric sibling species of whiptail lizards, genus *Cnemidophorus*.  
*J. Herpetol.*, 1, 1 – 20.
- WRIGHT, J.W. (1978) Parthenogenetic Lizards (Part II).  
*Science*, 201, 1152 – 1154. (Also see Part I: Vanzolini, P.E.; Part III: Cole, C.J.; and Part IV: Cuellar, O.)
- WRIGHT, J.W. and BROWN, W.M. (1980) Mitochondrial DNA analyses and evolution of bisexual and parthenogenetic lizards *Cnemidophorus*.  
 In: The University of British Columbia. Second International Congress of systematic and evolutionary biology, Vancouver, B.C., Canada, July 17 – 24, 1980. 441 p. University of British Columbia: Vancouver, B.C., Canada. Paper O, p. 399.
- WRIGHT, J.W. and DEGENHARDT, W.G. (1962) The type locality of *Cnemidophorus perplexus*.  
*Copeia*, 1962, 210 – 211.
- WRIGHT, J.W. and LOWE, C.H. (1965) The rediscovery of *Cnemidophorus arizonae* Van Denburgh.  
*J. Ariz. Acad. Sci.*, 3, 164 – 168.
- WRIGHT, J.W. and LOWE, C.H. (1967 – A) Hybridization in nature between

- parthenogenetic and bisexual species of whiptail lizards (genus *Cnemidophorus*.)  
*Am. Mus. Novit.*, 2286, 1 – 36.
- WRIGHT, J.W. and LOWE, C.H. (1967 – B) Evolution of the allopoloid partheno – species *Cnemidophorus tessellatus* (Say).  
*Mamm. Chrom. Newsl.*, 8, 95 – 96.
- WRIGHT, J.W. and LOWE, C.H. (1968) Weeds, polyploids, parthenogenesis, and the geographical and ecological distribution of all – female species of *Cnemidophorus*.  
*Copeia*, 1968, 128 – 138.
- WIJNANDS, H.E.J. (1977) Distribution and habitat of *Rana esculenta* complex in the Netherlands.  
*Neth. J. Zool.*, 27, 227 – 286.
- WIJNANDS, H.E.J. (1978) Plasma albumins and biometrical characteristics of different forms of *Rana esculenta* complex.  
*Zool. Jahrb. Abt. Syst. Oekol. Geogr. Tiere*, 105, 337 – 346.
- WIJNANDS, H.E.J. (1979 – A) Partial ecological solution of *Rana lessonae* and *Rana esculenta* as a mechanism for maintenance of the hybrid form, *Rana esculenta* (*Anura, Ranidae*).  
*Mitt. Zool. Mus. Berl.*
- WIJNANDS, H.E.J. (1979 – B) Kenmerken, verspreiding en voortbestaan van *Rana lessonae* Camerano, *Rana ridibunda* Pallas en hun hybride " *Rana esculenta* " Linnaeus (*Amphibia, Anura*) in Nederland.  
 Thesis, Univ. of Nijmegen.
- WIJNANDS, H.E.J. and VAN GELDER, J.J. (1976) Biometrical and serological evidence for the occurrence of three phenotypes of green frogs (*Rana esculenta* complex) in the Netherlands.  
*Neth. J. Zool.*, 26, 414 – 424.
- YAKUSHIJI, M., MATSUKUMA, T., ABE, M., NISHIDA, T., NISHINURA, H., TSUNAWAKI, A., and KATO, T. (1981) Ovarian tumors in children and adolescents less than 20 years age.  
*Acta Obstet. Gynecol. Jpn.*, 33, 833 – 838.
- YAMASHITA, K., WAKE, N., ARAKI, T., ICHINOE, K., and MAKOTO, K. (1979) Human lymphocyte antigen expression in hydatidiform mole: androgenesis following fertilization by a haploid sperm.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135, 597 – 600.

- YAO, T.S. and OLSEN, M.W. (1955) Microscopic observations of parthenogenetic embryonic tissues.  
*J. Hered.*, 46, 133 – 134.
- YUEN, B.H., and CANNON, W. (1981) Molar pregnancy in British Columbia: estimated incidence and postevacuation regression patterns of the beta subunit of human chorionic gonadotropin.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 139, 316 – 319.
- ZARTMAN, D.L. (1972) An aberrant parthenogenetic chicken embryo.  
*Poult. Sci.*, 51, 803 – 808.
- ZARTMAN, D.L. (1975) Attempted induction of gynogenesis in chickens.  
*Poult. Sci.*, 54, 1700 – 1703.
- ZWEIFEL, R.G. (1965) Variation in and distribution of the unisexual lizard, *Cnemidophorus tessellatus*.  
*Am. Mus. Novit.*, 2235, 1 – 49.
- ZWEIFEL, R.G. and LOWE, C.H. (1966) The ecology of a population of *Xantusia vigilis*, the desert night lizard.  
*Am. Mus. Novit.*, 2247, 1 – 57.

## HOOFDSTUK III

### EXPERIMENTELE PARTHENOGENESE BIJ ZOOGDIEREN

#### III – 1 Historisch overzicht tot 1960

Ter inleiding van de beschrijving van het eigen experimentele werk wordt eerst een beknopt historisch overzicht gegeven van de ontwikkelingen tot omstreeks 1960 rond de experimentele parthenogenese bij zoogdieren. Na 1960 – en vooral in de jaren zeventig – verschijnt er een groot aantal publikaties over dit onderwerp en worden veel nieuwe technieken geïntroduceerd. Voor verdere informatie over de vooruitgang, die met de verschillende technieken geboekt is, zijn de literatuurreferenties per techniek aan het einde van dit hoofdstuk opgenomen. Men spreekt van experimentele parthenogenese indien er sprake is van een parthenogenetische ontwikkeling, die door menselijk ingrijpen wordt geïnduceerd en waardoor er een afwijking ontstaat ten opzichte van het natuurlijke ontwikkelingspatroon.

Hoewel het werk aan de zijderups (beschreven in Tichomirow's publikatie uit 1886) door sommigen als de eerste beschrijving van de mogelijkheid van experimentele parthenogenese bij dieren wordt beschouwd, trekken andere onderzoekers de juistheid van deze experimenten en conclusies in twijfel. Deze twijfels berusten vooral op het feit, dat bij vele rassen van de zijderups, *Bombyx Mori*, natuurlijke parthenogenese voorkomt. Daarom worden de werken van Morgan (1896 – 1900), Mead (1898), Hertwig (1896) en Loeb (1899, 1900) over het algemeen beschouwd als de eerste beschrijvingen van de mogelijkheid om parthenogenese experimenteel bij dieren te induceren.

Het zou echter nog tot 1923 duren eer experimentele parthenogenese bij zoogdieren werd aangetoond. Deze eerste pogingen om parthenogenese bij zoogdieren te induceren werden door Novak en Eisinger (1923) in Wenen ondernomen. Zij bonden de eileiders van normaal bevruchte ratten af en ook die van dieren, welke door gesteriliseerde mannetjes gedekt waren. Dit afbinden gebeurde onder etherverdoving, hetgeen de interpretatie van de resultaten enigszins bemoeilijkte gezien de, later nog te bespreken, parthenogenetische inductie, welke als gevolg hiervan kan optreden. Op grond van de waarnemingen aan de eicellen uit de afgebonden eileider, achtten Novak en Eisinger bewezen, dat "auch das unbefruchtete Säugetierei sich zu teilen und wenigstens in dem Sinne weiter zu entwickeln vermag, dass aus ihm ein aus zahlreichen Zellen bestehendes, wenn auch nicht weiter in Keimblätter oder Organe differenziertes Gebilde entsteht". Hoewel zij zich de mogelijkheid van het optreden van fragmentatie realiseren, zijn zij toch

overtuigd van "eine wirkliche Teilung von unbefruchteten Eizellen" en voegen hieraan toe, dat het van de gehanteerde definitie afhangt of het door hen beschreven verschijnsel als parthenogenese aangemerkt kan worden.

Champy (1927) beschrijft een ogenschijnlijk normaal 8 – cellig embryo in een in vitro gekweekt konijne – ovarium. Dit zou eveneens opgevat kunnen worden als een voorbeeld van experimentele (ovariële) parthenogenese.

In een studie van het gedrag van onbevuchte eieren in vitro nam Pincus (1930) in 63,8% van 213 eieren delingen waar. De term "gedeeld" moet echter zeer ruim opgevat worden gezien zijn opmerking: "The term "divided" includes any degree of observable development beyond the one – celled stage of the ova as recovered from the animals." Wel blijkt Pincus zich de moeilijkheid te realiseren van het onderscheiden tussen werkelijke parthenogenese en fragmentatie. Dit essentiële probleem brengt hij als volgt onder woorden: "One question is common to the subject of ovarian parthenogenesis and the study here described, and that is – are we observing true parthenogenesis or merely degenerative fragmentation?" Hoewel hij bevestigt, dat bepaalde resultaten zonder twijfel toegeschreven moeten worden aan fragmentatie, houdt hij vast aan zijn zienswijze, dat "the many cases of regular cleavage observed are true parthenogenetic." Deze beschouwingen over parthenogenese en fragmentatie verklaren echter niet de discrepantie tussen het gedrag in vivo en in vitro, die door Pincus werd waargenomen. Hij vraagt zich dan ook af waarom deze ontwikkeling, wat die dan ook zijn moge, bij onbevuchte eieren in vivo zo zeldzaam voorkomt en zo dikwijls in vitro. Een van de mogelijke oorzaken kan de door verdamping van het medium ontstane hypertoniciteit zijn, temeer daar dit reeds bekend was uit proeven met eicellen van een zeeëgel (*Arbacia*), (Hunter 1901; Just, 1928). Om dit verder te onderzoeken werden door Pincus en Enzmann (1936 – A) een serie nieuwe experimenten gedaan, waarin het effect van bekende methoden van parthenogenetische stimulatie op konijne – eicellen onderzocht werd. Als criterium voor de daadwerkelijke inductie van een parthenogenetische ontwikkeling werd de afsnoering van het tweede poollichaampje genomen. Gevonden werd, dat een korte behandeling met oplossingen met een verlaagde osmotische waarde ten opzichte van die in de natuurlijke omgeving (de eileider en de uterus) een effectieve methode was. Een langere behandeling gaf slechte resultaten. Een korte blootstelling aan 45 – 47 graden Celsius bleek eveneens een uiterst effectief middel te zijn. Pincus en Enzmann concludeerden dan ook, dat bepaalde methoden, welke bij lagere vertebraten gebruikt werden om parthenogenese te induceren, ook effectief zijn voor zoogdier – eieren.

Later bepaalt Pincus (1939) de optima in duur en intensiteit van de behandelingen (Supranormale temperatuur en hypertonische oplossing). Bovendien transplanteerde hij in vitro gestimuleerde eicellen in pseudo – zwangere konijnen. "Their development closely paralleled that observed in vitro. Nineteen females receiving artificially activated ova were allowed to go to term. Three of these



produced young at term". Door deze drie vrouwtjes werden respectievelijk 12 vrouwtjes, drie mannetjes, één doodgeboren vrouwtje en één levend vrouwtje voortgebracht. De eerste recipiënt was pseudo – zwanger tengevolge van dekking door een steriele man; de andere twee tengevolge van injecties met een hypofyse – extract. Indien er echter sprake van parthenogenetisch ontwikkelde dieren zou zijn, is het onmogelijk, dat zich mannetjes ontwikkelen. Immers, alleen de mannelijke geslachtscellen bevatten een Y – chromosoom. Indien er dus geen genetische bijdrage van een mannelijke geslachtscel is geweest, kunnen nooit mannelijke nakomelingen uit eicellen ontstaan. Ook Pincus heeft zich dat gerealiseerd, vandaar dat hij in een ander artikel (1939) op deze resultaten terugkomt. Hij stelt dan vast, dat "in the case of the first litter, however, a probability exists that some of the offspring might have been developed from fertilized eggs since the recipient female was made pseudo – pregnant by mating with a vasectomized male. If this male were imperfectly vasectomized, or retained sperm for some time after vasectomy, he might have been the parent of the young" en verder: "since the latter were produced by does made pseudo – pregnant by pituitary extract, there could be no doubt that the young arose by parthenogenetic development".

Aansluitend aan een eerste korte mededeling (Pincus & Shapiro, 1940 – A) beschrijven deze zelfde auteurs (1940 – B) korte tijd later een uitgebreide serie experimenten met konijn – eicellen. Deze werden gedurende 3 – 5 minuten in verschillende hypo – en hypertonische oplossingen geïncubeerd. De beste resultaten werden verkregen door incubatie in hypertonisch serum. Bij 37,9% werd een poollichaampje afgesnoerd en 4,8% van de 353 onderzochte eicellen deelde zich (zonder fragmentatie). Soms werden ook bij de controle experimenten duidelijke tekenen van activatie waargenomen. Gezien het feit, dat door Pincus en Shapiro in een "koude" kelder (17 – 21 graden Celsius) werd gewerkt, waarin de eicellen een tot twee uur verbleven tussen isolatie uit de donor en de uiteindelijke incubatie in 37,5 graden Celsius, kwamen zij op het idee om na te gaan in hoeverre afkoeling ook een stimulans kan zijn voor activatie. Hiertoe incubeerden zij 34 eicellen gedurende 2 – 3,5 uur bij 17 – 21 graden Celsius en 46 eieren gedurende 15 – 85 minuten bij 6 graden Celsius. Na een verdere kweek van 20 – 24 uur bij 37,5 graden Celsius in konijnserum werden de eicellen gefixeerd en cytologisch onderzocht op tekenen van activatie. Ook werd het effect vastgesteld van hyper – en hypotonische gebalanceerde zoutoplossingen en van hypotonisch serum. In de afkoelingsexperimenten werd bij 52,5% activatie en bij 23,8% deling waargenomen; de overige behandeling respectievelijk 29,2 – 37,9% en 7,0 – 17,4%. De beste resultaten werden verkregen na een afkoeling van 10 – 30 minuten tot 6 graden Celsius. In een serie van 33 eicellen werden er 13 geactiveerd, waarvan er 10 gedeeld waren zonder de vorming van cytoplasmatische fragmenten; deze werden echter wel na langere incubatie gevonden. Besloten werd toen om de tubae 14 – 19 uur na een injectie met hypofyse – extract in situ af te koelen. Bij 16 aldus behandelde dieren werd in een geval een levend jong geboren.

Deze opzienbarende resultaten bleven niet onopgemerkt en kwamen herhaaldelijk in de publiciteit, onder andere in Time (Ratcliff, 1936, 1937). Een publiciteit, waarmede Pincus blijkens een uitlating van een van zijn medewerkers (Werthessen & Johnson, 1974) niet zeer gelukkig was. Tot op heden bestaan bij velen nog twijfels over de juistheid van de interpretatie van deze experimenten en wordt de parthenogenetische oorsprong van de levende jongen in twijfel getrokken. Hoewel afkoeling als effectieve stimulus van parthenogenese door Thibault (1949) en Chang (1952) werd bevestigd, is het tot op heden nog niemand gelukt met succes parthenogenetisch levende jonge zoogdieren te kweken. Wel zijn er de laatste jaren opzienbarende resultaten bereikt. Zo werd door Kaufman, Barton & Surani (1977) een hoog percentage doorgroei tot het eicyclinder – stadium bereikt bij diploïde muize – parthenogenonten en een klein percentage groeide zelfs door tot de aanleg van de voorpoten.

Beatty (1957) twijfelt niet aan de juistheid van de parthenogenetische oorsprong van de vijf jonge dieren, getuige zijn opmerking, dat "the fact that a male was not used at any stage of the experiments means that the five offsprings must be parthenogenetic, unless a procedural accident occurred several times" en "the failure of Thibault and of Chang to obtain born parthenogenones does not amount to a disproof of Pincus and Shapiro."

In een biografische herinnering aan Pincus, trekt Ingle (1971) de veronderstelde experimentele parthenogenese sterk in twijfel ("Pincogenesis"), hetgeen een reactie ontlokt aan een oud – collega en vriend van Pincus (Werthessen & Johnson, 1974). Gezien het feit, dat Werthessen de uitvoering van de experimenten van zeer nabij heeft meegemaakt en deels eraan meegewerkt heeft, mag er grote waarde aan dit artikel gehecht worden. In het artikel wordt achtergrondinformatie gegeven over de opzet van de experimenten en de argumentatie voor de keuze van het konijn als proefdier (en niet de rat of de muis). Tevens wordt uitgelegd waarom Pincus de experimenten niet herhaald heeft na de tweede wereldoorlog. Tenslotte is van groot belang, dat er levende parthenogenonten werden geboren uit een moeder, die niet in contact was geweest met een gevasectomeerd mannetje, doch waarbij het corpus luteum in het begin gestimuleerd was door exogeen toegediend gonadotropine.

Moricard en De Fonbrune (1937) isoleerden oöcyten uit follikels van ratte – en muize – ovaria en kweekten deze verder in verschillende media met en zonder extracten van fragmenten van verschillende weefsels (hypofyse, testis, schildklier, enzovoort) en eventueel met toevoeging van vitaminen, toxinen en hormonen. Zij vonden onder andere, dat in 24 van de 52 bestudeerde ratte – en muize – oöcyten de vorming van het eerste poollichaampje optrad wanneer zij in hun eigen, respectievelijk soorteigen, sera gekweekt werden met een stukje hypofyseweefsel. Zeven van deze 24 oöcyten vertoonden verdere parthenogenetische ontwikkeling tot

het twee, drie – en viercellig stadium. In hoeverre bij deze parthenogenonten ook een tweede poollichaampje gevormd was, wordt helaas niet vermeld.

Reinmann en Miller (1939) beschrijven een geval van parthenogenese bij een eicel van de mens. De afsnoering van poollichaampjes werd waargenomen na het aanprikken van het ei met behulp van een micromanipulator en een verdere kweek in een hangende druppel menselijk bloedserum, waaraan een "druppeltje" ethylacetaat was toegevoegd. Gegevens over experimenten met vier andere eicellen worden terloops genoemd en zouden later gepubliceerd worden. Voor zover kon worden nagegaan is dit echter niet gebeurd. Wel concluderen Reinmann en Miller: "The human ovum is capable of being artificially stimulated to parthenogenetic activity. The implications of this finding are many and varied. There are mentioned but two: its relation to dermaoids, teratomas, etc., and its bearing on concept of potency". Deze mogelijke relaties zijn reeds eerder beschreven in hoofdstuk II – 7.3. Uit de beschrijving van de afsnoering van de poollichaampjes is echter af te leiden, dat er alleen sprake was van het uitstoten van wat cytoplasma door het aangeprikte gaatje. Dit mede op grond van het feit, dat het tweede poollichaampje volgens Reinmann en Miller reeds 25 minuten na het eerste ontstond, terwijl het eerste reeds vijf minuten na het aanprikken werd gevormd.

Thibault (1947) verkreeg bij konijne – eicellen circa 50% activatie na afkoeling in situ tot 6 graden Celsius. Na 48 – 79 uur in vivo doorgroei vond Thibault acht morula's tussen de 19 geïsoleerde oöcyten uit de drie recipiënten. Hoewel enige morula's degeneratieverschijnselen vertoonden, zagen de meeste er normaal uit.

Een jaar later beschrijft Thibault (1948) het optreden van een rotatie van de kernspoel van de tweede rijpingsdeling. Deze rotatie vond plaats ongeveer 30 minuten na het toedienen van de koude shock. (Afsnoering van het tweede poollichaampje treedt bijna nooit op). Weer 1 – 1,5 uur later nam hij het begin van de telofase waar. Dit verschil tussen de reactie van ratte – eicellen en konijne – eicellen op afkoeling (bij de rat een afsnoering van het tweede poollichaampje zonder verdere delingen en bij het konijn geen afsnoering van het tweede poollichaampje, doch wel delingen) wordt nogmaals door Thibault en Ortavant (1949) benadrukt. Bij het schaap wordt het tweede poollichaampje ongeveer vier uur na een drie minuten durende koude – behandeling (0 graden Celsius) afgesnoerd en vormt zich een haploïde kern in de eicel. Deze reactie komt dus overeen met die van het konijn.

In een overzichtsartikel (Thibault, 1949 – B) over het reeds hiervoor genoemde werk (Thibault, 1948, 1949, en Thibault & Ortavant, 1949 – A) en aangevuld met de resultaten van nieuw onderzoek, beschrijft Thibault het effect van afkoeling op de ontwikkeling van konijne – , schape – en ratte – eicellen. Incubatie in vitro bij 6 graden Celsius van uit de tubae geïsoleerde konijne – eicellen werd met slechts 2, 7, 6 en 9 eicellen uitgevoerd, die respectievelijk gedurende 5 uur, 7 uur, 8 uur en 40

minuten en 30 uren doorgekweekt werden. Wanneer Thibault de resultaten van deze groepen bijeenbrengt, komt hij uit op een activatiefrequentie van 62%. Het lijkt enigszins overdreven om op grond van het kleine aantal eicellen en het geringe verschil met het resultaat van Pincus en Shapiro (53%) tot de volgende uitspraak te komen: "Cette proportion est donc supérieure a celle qui a été obtenue par Pincus et Shapiro". Temeer daar Thibault in de vijf door hem gestelde criteria voor activatie ook een 90 graden rotatie van de kernspoel van de tweede meiotische deling opneemt. Pincus en Shapiro daarentegen beschouwen de oöcyten pas als geactiveerd wanneer zij een of meerdere kernen bezitten of wanneer deling is opgetreden. Bovendien kweekten zij de eicellen veel langer door na de afkoeling, waardoor het mogelijk is, dat een belangrijk gedeelte aan hun aandacht ontsnapte doordat, zoals zij zelf opmerken, bepaalde eicellen degenereren nadat ze geactiveerd zijn. Thibault vindt het criterium van kernspoelrotatie echter reeds voldoende omdat "men zón rotatie bij degenererende eicellen in de tubae nooit waarneemt". Een volgend experiment van Thibault (1949 – A) bestond uit het afkoelen van tuba – eicellen in situ tot 6 graden Celsius volgens een door Pincus en Shapiro beschreven methode. Vier, twee, zeven en nogmaals zeven eicellen werden aldus respectievelijk gedurende 20, 15, 20 en 15 minuten afgekoeld. Het activatiepercentage, dat op basis van de resultaten werd vastgesteld, bedroeg 65%. Ook werden eicellen tot circa 0 graden Celsius afgekoeld door een stuk smeltend ijs gedurende drie tot vier minuten tegen het gebied van de tubae te houden, waarin zich de eicellen bevonden. Het aldus verkregen activatiepercentage bedroeg nu 88% van een serie van 79 eicellen. Twee geactiveerde eicellen snoerden het tweede poollichaampje af (een van deze beide eicellen vormde een haploïde pronucleus). Drie andere geactiveerde eicellen vormden een diploïde pronucleus. Op dezelfde wijze werden door Thibault 11 schape – eicellen behandeld: drie minuten in situ afkoelen met smeltend ijs. Als eerste reactie constateerde Thibault een 90 graden rotatie van de kernspoel. In de onderzochte eicellen werden 4 – 48 uur na afkoeling 6 rotaties waargenomen. Bovendien vormden zich in twee gevallen een tweede poollichaampje; in één geval een diploïde kern en werd er voorts één gedeelde oöcyt gevonden. Een zeer opmerkelijk resultaat werd verkregen bij ratte – eicellen: drie tot vier minuten in situ afkoeling met smeltend ijs van een groep van 47 oöcyten toonde 100% activatie aan en bovendien in alle gevallen de afsnoering van het tweede poollichaampje; dit laatste had reeds na 90 minuten plaatsgevonden. In controle – experimenten, die opgezet waren om de eventuele invloed van etherverdoving te onderzoeken, werden bij een langere anesthesie hogere activatiepercentages verkregen, te weten: na 6 minuten 0%; na 10 – 12 minuten 35% en na 15 – 20 minuten 76%. Ether speelt dus duidelijk een rol bij de activatie. Bij in vitro experimenten werden de volgende activatiepercentages bereikt: 94% bij afkoeling tot 0 – 3 graden Celsius gedurende 3,5 – 4 minuten (18 oöcyten). Bij de andere activatiemethoden (incubatie in hypertoonische (5 minuten) en hypotonische (4 en 15 minuten) oplossingen en verwarming tot 46 graden Celsius), werden zo weinig eicellen gebruikt (respectievelijk 5, 7 en 5, en 6 oöcyten), dat het niet juist is om in deze gevallen activatiepercentages te bepalen. Gezien de activerende rol van

de etherverdoving is het jammer, dat de tijdsduur van de narcose niet vermeld wordt bij de activatieresultaten na afkoeling. Ook het feit, dat Thibault geen blanco experimenten in vitro uitgevoerd heeft, is een reden waarom de door hem gegeven activatiepercentages zeer sceptisch beschouwd dienen te worden. Later bleek immers, dat het tweede poollichaampje zich bij verschillende diersoorten spontaan afsnoert; bij de fret (Chang, 1950); bij de hamster (Austin, 1956; Chang & Fernandez – Cano, 1958) en bij de rat (Austin, 1951; Austin & Braden, 1954 – C en Zeilmaker et al., 1974)

Chang (1952) stelde eicellen in vitro bloot aan verschillende temperaturen en onderzocht daarna het effect van deze behandeling op het percentage alsnog bevruchte eicellen na transplantatie in een recipiënt. Bij alle onderzochte temperaturen werd geconstateerd, dat er minder eicellen bevrucht werden indien zij een langere preincubatie periode hadden ondergaan. Indien de eicellen gedurende drie kwartier in 45 graden Celsius geïncubeerd werden was bevruchting niet meer mogelijk. Bij lagere temperaturen (0, 10 en 24 graden Celsius) was een steeds langere incubatie mogelijk zonder het geheel verloren gaan van de mogelijkheid van bevruchting. Bij gelijke incubatieperioden werd bij lagere temperaturen een hoger percentage bevruchte eicellen waargenomen. Ten aanzien van de activatieverschijnselen na de incubaties bij de verschillende temperaturen werden de volgende waarnemingen gedaan: incubatie bij 45 graden Celsius had bij geen enkele toegepaste incubatieperiode activatie tot gevolg terwijl er steeds een optimale incubatietijd werd gevonden na incubatie bij 38, 24, 10 en 0 graden Celsius.

Chang (1954) incubeerde ratte – eicellen gedurende 24 uur bij 10 graden Celsius. Daarna werden deze eicellen getransplanteerd in pseudozwangere recipiënten. Zes dagen later had 18% van de eicellen zich ontwikkeld tot parthenogenetische blastocysten. Hiervan zag 28% er "normaal" uit, was 33% gekrompen en 39% gedegeneerd. De "normale" blastocysten vertoonden een grote gelijkenis met die, welke zich uit een normaal bevruchte eicel ontwikkelen.

Austin & Braden (1954 – A) isoleerden 7284 ratte – , 1120 muize – en 221 konijne – eicellen uit tubae. Onder deze aantallen vonden zij respectievelijk 9, 1 en 1 abnormaal grote exemplaren. Alleen bij de ratte – eicellen werd in slechts vier gevallen gynogenese of parthenogenese waargenomen. Na normale en verlate bevruchting werden namelijk respectievelijk 1 en 1 gynogenetische, en 0 en 2 parthenogenetische, ontwikkelingen gevonden. In beide gevallen van gynogenese lag het middenstuk van de zaadcel in een kleine, duidelijk van de rest van de vitellus gescheiden, hoeveelheid cytoplasma. De twee parthenogenetisch geactiveerde eicellen vertoonden beide een grote, duidelijk gevormde, kern, maar geen tekenen, die op de aanwezigheid van een zaadcel duiden. De kernen vertoonden qua grootte en structuur een sterke overeenkomst met de vrouwelijke pronucleus, die na normale bevruchting gevormd wordt.

Het eerste artikel over in vivo inductie van parthenogenese bij muize – eicellen is eveneens afkomstig van Braden & Austin (1954 – A). Zowel warme als koude incubatie en etherverdoving werden als activatiemethoden gebruikt. Vier tot vijf uur na een incubatie bij verhoogde temperatuur werd 84% activatie waargenomen bij 67 eicellen. Van deze geactiveerde eicellen degenereerde 39% terwijl bij 42% pronuclei werden gevormd en bij 7,5% zich "a form of cleavage" toonde, waarbij echter in geen enkel geval een tweede poollichaampje was gevormd. Braden & Austin introduceerden hiervoor de term "immediate cleavage", waarmede zij willen aangeven, dat de kernspoel door de schok van de temperatuursverandering naar het midden van de eicel migreert, waarna er in plaats van de ongelijke deling (afsnoering van het tweede poollichaampje) een equatoriale deling optreedt. In de 28 eicellen, waarin pronuclei gevormd waren, was er één exemplaar, waarin zich slechts één pronucleus gevormd had en geen poollichaampje. De overige exemplaren hadden wel een poollichaampje en een pronucleus gevormd. Acht – en – veertig tot 70 uur na een "warmtebehandeling" werden 74 eicellen uit tubae geïsoleerd: bij 55 exemplaren was fragmentatie opgetreden, terwijl 15 van de overige 19 eicellen zich gedeeld hadden. Van deze 19 gedeelde eicellen hadden zich 15 tot het tweecellig stadium en vier tot het viercellig stadium ontwikkeld. Een etherverdoving bij 12 muizen, 10 – 14 uur na ovulatie, gedurende 15 minuten resulteerde 4 – 5 uur later in 10% activatie bij 98 eicellen. Hiervan had 88% een pronucleus gevormd en had de overige 12% het tweecellig stadium bereikt. Negentien tot twintig uur na de verdoving was ca. 50% geactiveerd, waarvan 90% tweecellig en 10% viercellig. Deze gedeelde eicellen waren waarschijnlijk alle van het "immediate cleavage" type.

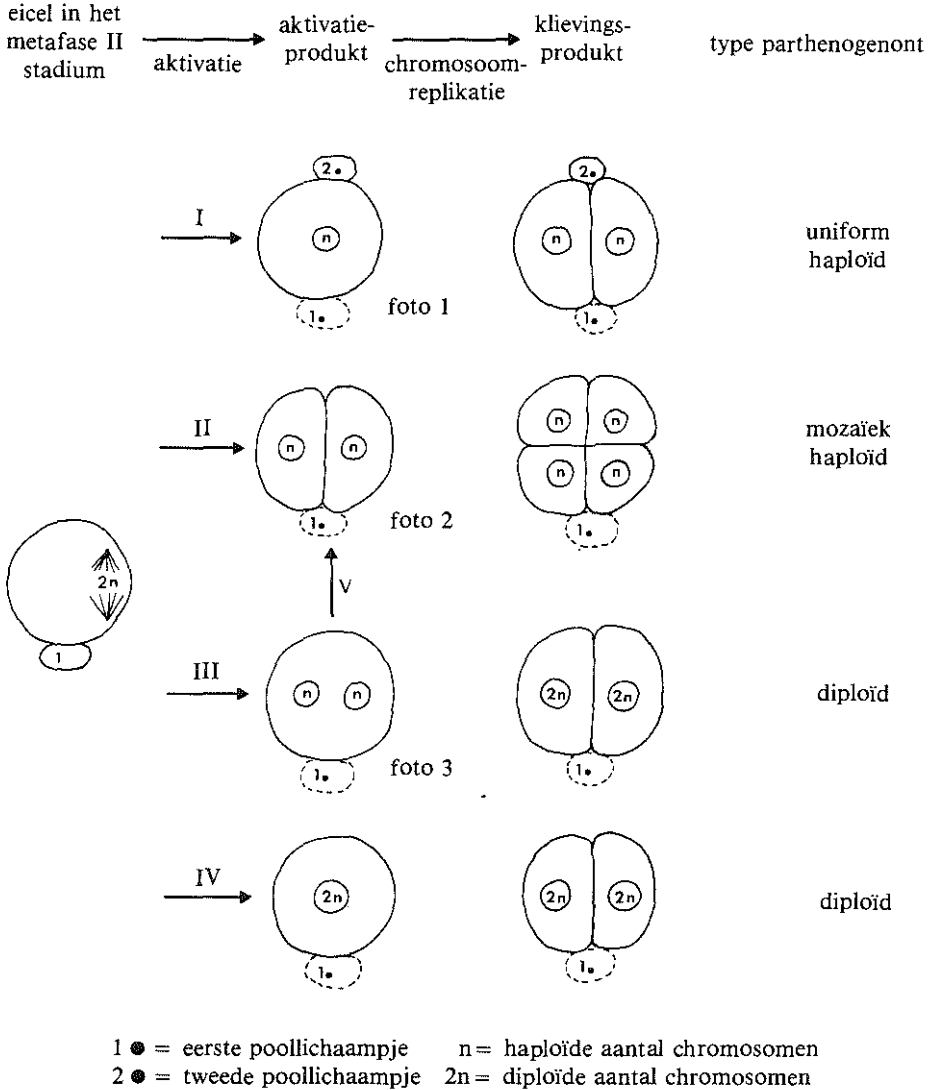
Ook in het eigen experimentele werk werd dit type parthenogonot vaak waargenomen. Figuur II geeft een schematisch overzicht van de verschillende typen parthenogononten, die werden waargenomen en de wijze waarop zij zijn ontstaan. De foto's 1, 2, 3 en 4 illustreren de mikroskopische beelden van deze verschillende typen parthenogononten terwijl tevens een foto van een normaal bevruchte eicel is opgenomen (foto 5). In hoofdstuk III zijn ook foto's opgenomen van deze typen parthenogononten, doch daar betreft het opnamen van chromosoompreparaten (foto's 9 tot en met 13).

Hoewel een incubatie van ratte – eicellen bij lage temperatuur effectief was gebleken (Austin & Braden, 1954; Thibault, 1949) werd bij muize – eicellen geen enkele activatie waargenomen na een dergelijke behandeling.

In een ander artikel vermeldden Braden & Austin (1954 – B), dat een "warmtebehandeling" drie uur na copulatie het percentage polyspermie verhoogt van 0,3% (normaal aanwezig na bevruchting) tot 3,8%. Bovendien stijgt het percentage eicellen, waarin de vorming van het tweede poollichaampje onderdrukt is, van 0,5 tot 12,4%. Triploidie is dan ook meestal een gevolg van de onderdrukking van de vorming van het tweede poollichaampje en niet van een dubbele bevruchting,



**FIGUUR II**  
**WAARGENOMEN ONTWIKKELINGSPATRONEN NA**  
**PARTHENOGENETISCHE AKTIVATIE**





## FIGUUR II

Figuur II is een schematische weergave van de waargenomen ontwikkelingspatronen na parthenogenetische aktivatie.

- I. De eicel voltooit de tweede meiotische deling op normale wijze en vormt een tweede poollichaampje (n) en een pronucleus (n).  
Langs dit aktivatiepatroon worden uniform haploïde parthenogenonten verkregen.
- II. De eicel deelt zich zeer snel na de aktivatie, "onmiddellijk delend", en vormt geen tweede poollichaampje doch twee, qua volume, gelijke delingsprodukten. Een cel bevat de pronucleus terwijl de andere cel de chromosomen bevat die normaal in het tweede poollichaampje terecht zouden zijn gekomen. In tegenstelling tot het tweede poollichaampje dat degenereert en geen betekenis meer heeft voor de verdere ontwikkeling, nemen in dit geval beide delingsprodukten in dezelfde mate deel aan de verdere ontwikkeling. Omdat er nu echter twee cellen zijn ontstaan met ieder verschillende chromosomen spreekt men van mozaïek haploïde parthenogenonten in tegenstelling tot die welke via patroon I zijn verkregen en die uniform haploïd worden genoemd.
- III. De afsnoering van het tweede poollichaampje wordt onderdrukt en de chromosomen verdelen zich in twee haploïde pronuclei. In beide pronuclei wordt het aantal chromosomen verdubbeld waarna zij zich allen in een kernspoel verenigen tijdens de eerste klievingsdeling. Op deze wijze ontstaan diploïde parthenogenonten. Sommige geaktiveerde eicellen van dit type vertonen een afwijkend patroon, V, en ondergaan een cytoplasmatische deling voor de chromosoomverdubbeling terwijl na de chromosoomverdubbeling nogmaals een klievingsdeling plaats vindt zodat gelijke type parthenogenonten worden verkregen als via patroon II. Dit type wordt ook wel "vertraagd onmiddellijk delend" genoemd.
- IV. De afsnoering van het tweede poollichaampje wordt onderdrukt en de chromosomen verenigen zich in één pronucleus en vormen na de chromosoomverdubbeling diploïde parthenogenonten.
- V. Zie in de bovenstaande tekst bij punt III, de tweede alinea.

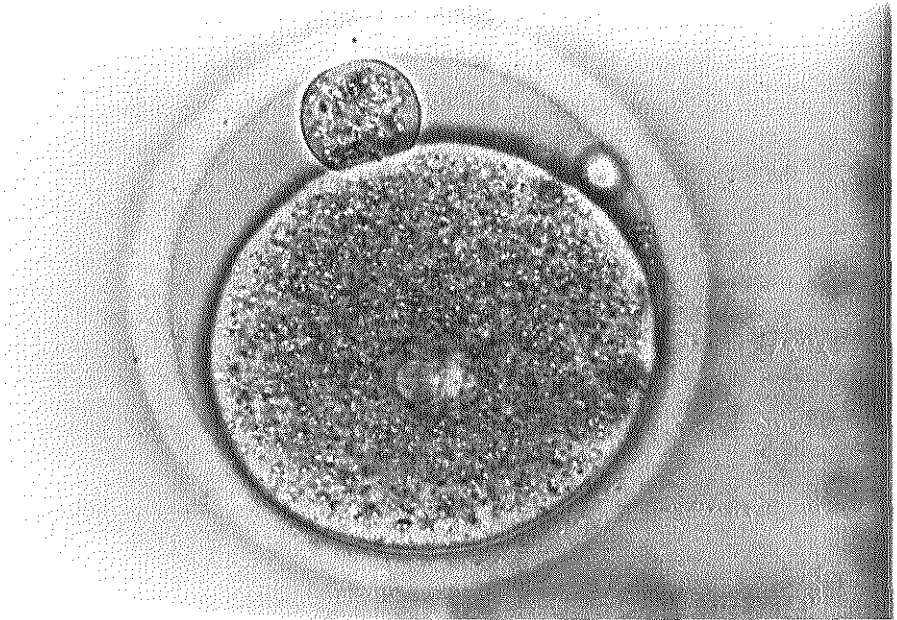


FOTO 1

Foto 1 geeft een beeld van een haploïde parthenogenont type 2pb1pn. Het tweede poollichaampje is scherp in beeld (midden boven). De rest van het eerste poollichaampje is eveneens zichtbaar: midden rechts. Schuin boven dit restant, de lichte vlek, zijn de contouren van een cumuluscel in beeld. Deze cel bevindt zich aan de buitenzijde van de zona pellucida. Iets onder het midden van het cytoplasma bevindt zich tenslotte de pronucleus (mikroskoopvergroting 40x1,6).



FOTO 2

Foto 2 is een opname van een haploïde parthenogenont type i.c. Links naast de bovenste cel bevindt zich het restant van het eerste poollichaampje. Een tweede poollichaampje is uiteraard niet aanwezig. Centraal in beide cellen zijn de kernen enigszins vaag te onderscheiden omdat de scherpstelling van de foto op de celmembranen was gericht en de kernen toen niet geheel in focus waren (mikroskoopvergroting 25x2,0).

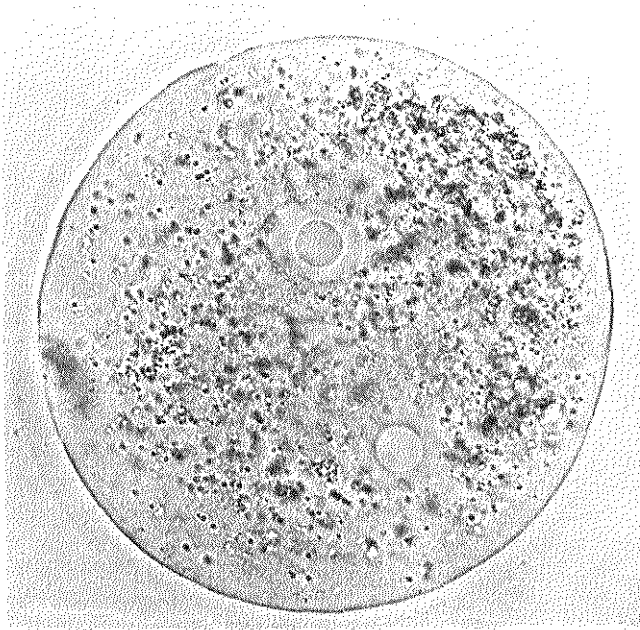


FOTO 3

Foto 3 geeft een beeld van een diploide parthenogenont type 2pn. De twee pronuclei, beide van de eicel, zijn duidelijk waarneembaar terwijl er geen tweede poollichaampje aanwezig is. De resten van het eerste poollichaampje zijn op deze foto niet meer te herkennen (mikroskoopvergroting 40x1,25).

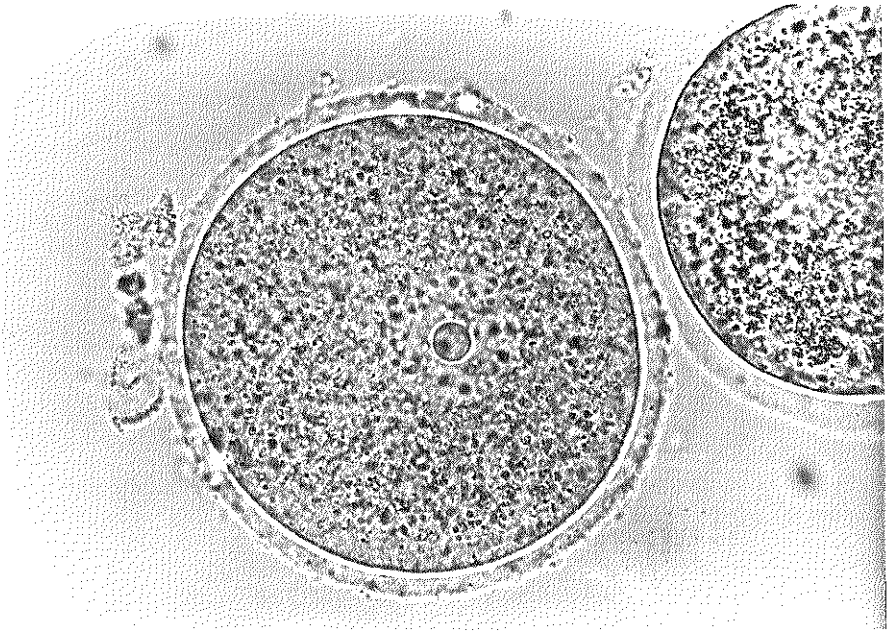


FOTO 4

Foto 4 geeft, evenals foto 3, een beeld van een diploïde parthenogenont. In dit geval betreft het echter type 1pn. Deze ene pronucleus is goed waarneembaar iets rechts van het midden (mikroskoopvergroting 40x1,25).

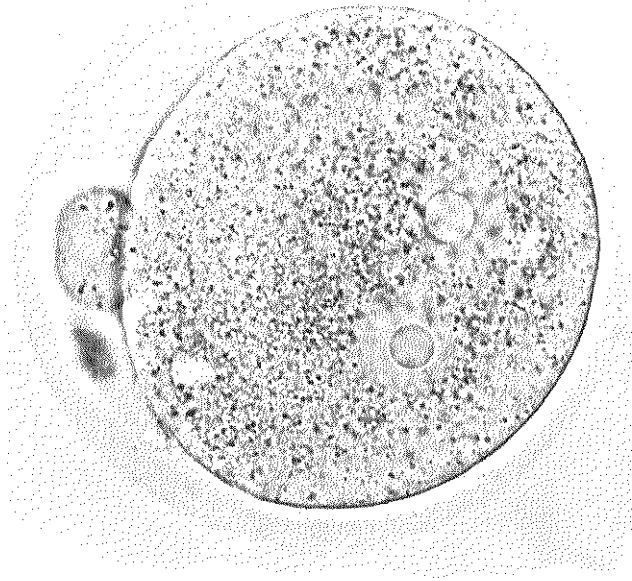


FOTO 5

Foto 5 geeft een beeld van een normaal bevruchte eicel. Links in de perivitelline ruimte is het tweede poollichaampje duidelijk te onderscheiden terwijl de rest van het eerste poollichaampje iets lager op de foto nog vaag aanwezig is. Binnen het cytoplasma zijn de twee pronuclei goed te onderscheiden (mikroskoopvergroting 25x2,0).

aldus Braden & Austin. "Delayed fertilization" leidt in sommige gevallen tot het bevruchten van een zich parthenogenetisch ontwikkelend ei.

Ongeveer één uur na het toedienen van verschillende verdovingen bij ratten trad de vorming van het tweede poollichaampje op (Austin & Braden, 1954 – B). Een maximale activatiefrequentie werd bij een 15 minuten durende etherverdoving gevonden; deze bedroeg dan 64%. Bij lachgas daarentegen trad een maximale activatiefrequentie op (75%) na een 30 minuten durende verdoving. Een "koudebehandeling" (ijs) leidde in bijna alle gevallen (99%) tot de vorming van het tweede poollichaampje. Een "warmtebehandeling" (45 graden Celsius) daarentegen in geen enkel geval. Na inductie van de vorming van het tweede poollichaampje door de "koudebehandeling" kan een zaadcel toch nog de eicel binnendringen; het blokkeringsmechanisme tegen polyspermie is onaangetast en het lijkt erop of een normale bevruchting en klieving kan volgen. Een "warmtebehandeling" veroorzaakt wel een hoge mate van polyspermie: 16%. Austin & Braden (1954 – B) weerleggen de opvatting van Thibault (1949), dat de activatie tengevolge van etherverdoving deels veroorzaakt wordt door een directe werking op de eicel en deels door de daling van de lichaamstemperatuur, die bij verdoving optreedt. Zij constateren een minstens zo sterke daling van lichaamstemperatuur na het toedienen van een subcutane injectie met nembutal, maar in dit geval niet meer activatie dan in de controle – experimenten.

Verdere ontwikkelingen tot 48 uur na een "koudebehandeling" van ratte – eicellen worden door Austin & Braden (1954 – B) beschreven. Er werden tweecellige structuren waargenomen, die zeer sterk op tweecellige embryo's leken; meestal was een tweede poollichaampje nog zichtbaar.

De eerste experimenten om parthenogenese bij hamsters te induceren werden door Austin (1956) gepubliceerd. Zowel bij ratten als hamsters werd door Austin hypothermie geïnduceerd met een methode zoals door Andjus & Lovelock (1955) en door Andjus & Smith (1955) voor ratten werd beschreven en door Smith, Lovelock & Parkes (1954) en Smith & Lovelock (1955) voor hamsters. Verlaging van de lichaamstemperatuur tot 0 – 1 graden Celsius voor de ovulatie gaf bij ratte – eicellen slechts 4% activatie; na de ovulatie echter 100%. Daarbij bleek echter een geringere tendens tot verdere parthenogenetische ontwikkeling op te treden dan in die gevallen, waarin de activatie het gevolg was van een lokale afkoeling van de tubae. Hamsters vertonen spontane activatie, die oploopt van 0% (8 – 12 uur na ovulatie) via 17% (13 – 17 uur na ovulatie) tot 76 – 81% (18 – 34 uur na ovulatie). De meeste van deze geactiveerde eicellen bezaten een kern en twee poollichaampjes. Afkoeling van hamsters voor de ovulatie had in geen van de 46 uit deze dieren geïsoleerde eicellen enige vorm van activatie tot gevolg. Afkoeling tot 0 – 1 graden Celsius, 3 – 5 graden Celsius en 8 – 16 graden Celsius na ovulatie leidde daarentegen tot respectievelijk 80, 81 en 86% activatie. Slechts 34% van de eicellen werd geactiveerd na afkoeling van de dieren tot 20 – 25 graden

Celsius. In de meeste gevallen werden kernen en twee poollichaampjes waargenomen. Wel moet er rekening mee gehouden worden, dat onbehandelde eicellen (13 – 17 uur na ovulatie) circa 17% spontane activatie vertonen, zodat de geïnduceerde activatie dientengevolge waarschijnlijk 60 – 70% bedraagt.

Opvallend is, dat er na dit artikel van Austin (1956) ongeveer 15 jaar geen werk meer wordt gepubliceerd over experimentele parthenogenese bij zoogdieren. En dat juist in een periode, waarin de natuurlijke parthenogenese bij gewervelde dieren "ontdekt" wordt, hetgeen een stimulans zou kunnen betekenen voor verder experimenteel werk. Na deze "rustperiode" verschijnt er echter in de jaren zeventig een groot aantal publikaties over experimentele parthenogenese bij zoogdieren.

### **III – 2 Experimentele Parthenogenese bij Zoogdieren na 1960**

Gedurende de laatste twee decennia zijn er verschillende nieuwe technieken ontwikkeld om eicel – activatie en parthenogenese bij zoogdieren te induceren. De literatuur (over deze recente technieken) is in verschillende overzichtsartikelen samengevat (Graham, 1974; Tarkowski, 1975, Kaufman, 1975, 1978; Whittingham, 1980). In dit proefschrift zal dan ook volstaan worden met een verwijzing naar deze artikelen. Tevens worden hierna in III – 3 de verschillende technieken en de daarbij behorende literatuur vermeld. De literatuur, die betrekking heeft op de methoden, die bij het eigen experimentele werk zijn gebruikt, zal wel in het betreffende hoofdstuk worden beschreven.



**III – 3 Literatuurverwijzingen op auteur, systematisch ingedeeld volgens de verschillende toegepaste technieken.**

**TOEGEPASTE TECHNIEKEN LITERATUUR – REFERENTIES**

**I Fysische technieken**

*1. Thermische inductie*

1.1 Afkoeling

Pincus, 1939; Pincus & Shapiro, 1940 – A en B; Thibault, 1942, 1947 – A en B, 1948, 1949; Thibault & Ortavant, 1949; Chang, 1952, 1954; Austin & Braden, 1954 – A en B; Braden & Austin, 1954 – B; Austin, 1956; Graham, 1970; Longo, 1974, 1975; Gulyas, 1974, 1975 – B; Yamada et al., 1978.

1.2 Verwarming

Pincus & Enzmann, 1936; Thibault, 1947; Chang, 1952; Austin & Braden, 1954 – A; Braden & Austin, 1954 – A en B; Komar, 1973; Gwatkin et al., 1973; Balakier & Tarkowski, 1976; Baumgartner & Chrisman, 1981 – A en B.

*2. Elektrische inductie*

Tarkowski et al., 1970; Witkowska, 1973 – A en B; Kaufman et al., 1975; Gwatkin et al., 1975; Van Blerkom & Runner, 1976; Gulyas, 1976 – A en B; Zamboni et al., 1976; Patterson & Zamboni, 1976; Hausmann, Gebauer & Grimm, 1978; Gebauer & Hausmann, 1977; Hentschel & Hausmann, 1980.

*3. Mechanische inductie  
aanprikken*

Uehara & Yanagimachi, 1977.

**II Chemische Technieken**

*1. Inductie ten gevolge  
van anesthesie*

Novak & Eisinger, 1923; Thibault, 1949; Austin & Braden, 1954 – A; Braden &

- Austin, 1954 – B; Tarkowski et al., 1970; Witkowska, 1973 – A en B; Siracusa, Whittingham, Codonesu & De Felici, 1978; Kaufman, 1975 – A en B, 1977.
2. *Osmotische inductie* Pincus & Enzmann, 1936; Pincus 1939 – B; Pincus & Shapiro, 1940; Thibault, 1947; Graham, 1972; Solter et al., 1974” Kaufman & Surani, 1974; Kaufman & Gardner, 1974; Graham & Deussen, 1974; Iles et al., 1975.
3. *Enzymatische inductie*
- 3.1 Trypsine Pincus & Enzmann, 1936.
- 3.2 Hyaluronidase Graham, 1969, 1970, 1971, 1972, 1975; Kaufman, 1973 – A en B; Graham & Deussen, 1974; Solter et al., 1974; Iles et al., 1975; Kaufman & Sachs, 1975;1976; Van Blerkom & Runner, 1976; Abramczuk et al., 1977; Yamada & Yuhara, 1978; Komar, 1982.
4. *Ionogene inductie*
- 4.1 Calcium en magnesium Whittingham & Siracusa, 1976, 1978; Azim et al., 1977; Surani & Kaufman, 1977; Surani, Barton & Kaufman, 1977; Kaufman et al., 1977; Kaufman, 1978 – A en B; Kaufman , Guc – Cubrilo & Lyon, 1978; Whittingham, Siracusa & Fulton, 1978.
- 4.2 Calcium – ionophoren Fulton & Whittingham, 1978; Steinhardt et al., 1974.
5. *Eiwitsynthese remmers* Siracusa, Whittingham, Molinaro & Vivarelli, 1978.
6. *Mitose remmers* Austin & Braden, 1954 – A.
7. *In vitro incubatie* Pincus & Enzmann, 1936; Komar, 1973;

- |   |   |
|---|---|
|   | Kaufman & Surani, 1974; Kaufman, Barton & Surani(1977)  |
| 8. <i>Incubatie in alcohol</i>          | Dyban & Khorzhia, 1980; Eusebi & Siracusa, 1983; Kaufman, 1982; Kaufman et al., 1983; Robertson et al., 1983. |
| 9. <i>Incubatie in zuur</i>             | Pincus & Enzman, 1936; Pesonen, 1950.   |
| 10. <i>Inductie door plantehormonen</i> | Pesonen, 1950.  |
| 11. <i>Inductie door enzymremmers</i>   | Pesonen, 1950.  |

### III Fysiologische technieken

- |  |   |
|--|---|
| 1. <i>Genetisch geïnactiverde zaadcellen</i> | Austin, 1951.   |
| 2. <i>Verlate bevruchting</i>                | Austin & Braden, 1954 – C; Braden & Austin, 1954 – B. |

Met deze technieken kan men niet alleen een onderscheid maken tussen een in vivo en een in vitro behandeling, bijvoorbeeld verwarming van de eicellen in vitro en in vivo (Komar, 1973), maar tevens worden de technieken dikwijls in combinatie toegepast zoals bijvoorbeeld hyaluronidase behandeling en incubatie in een hypotoon medium (Kaufman & Gardner, 1974; Kaufman & Surani, 1974; Graham & Deussen, 1974), een hyaluromidase behandeling en een afkoeling van de eicellen (Yamada, Utsumi & Yuhara, 1978), incubatie in een zuur gevolgd door incubatie in hypertoon medium (Pincus & Enzman, 1936) of eicellen blootstellen aan een ionophoor, gevolgd door incubatie in medium zonder calcium – en magnesium – ionen (Steinhardt & Epel, 1974; Steinhard et al., 1974).



## HOOFDSTUK IV

### INLEIDING TOT HET EIGEN ONDERZOEK

#### IV – 1. Enige gegevens over de voortplanting van de laboratoriummuis

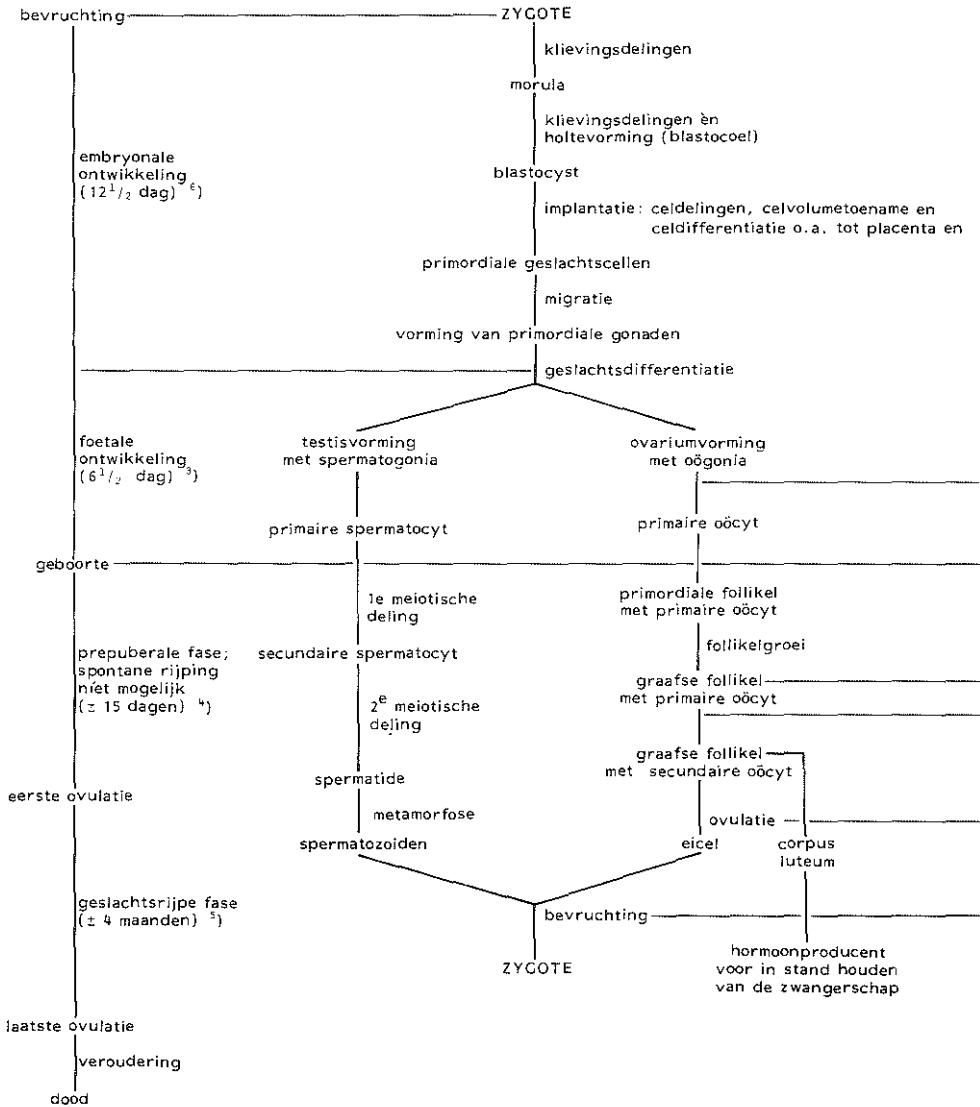
Ter verduidelijking van de hierna beschreven experimenten zal allereerst nader ingegaan worden op de verschillende facetten van de voortplanting van de laboratoriummuis (IV – 1). Teneinde de leesbaarheid van de volgende hoofdstukken te bevorderen, in de zin van een zo gecomprimeerd mogelijke beschrijving van het experimentele werk, worden de materialen en methoden welke in de verschillende experimenten zijn toegepast hier gezamenlijk onder een noemer beschreven (IV – 2). Wanneer er echter bij bepaalde experimenten afwijkingen dan wel aanvullingen optreden dan worden deze in het betreffende hoofdstuk expliciet vermeld.

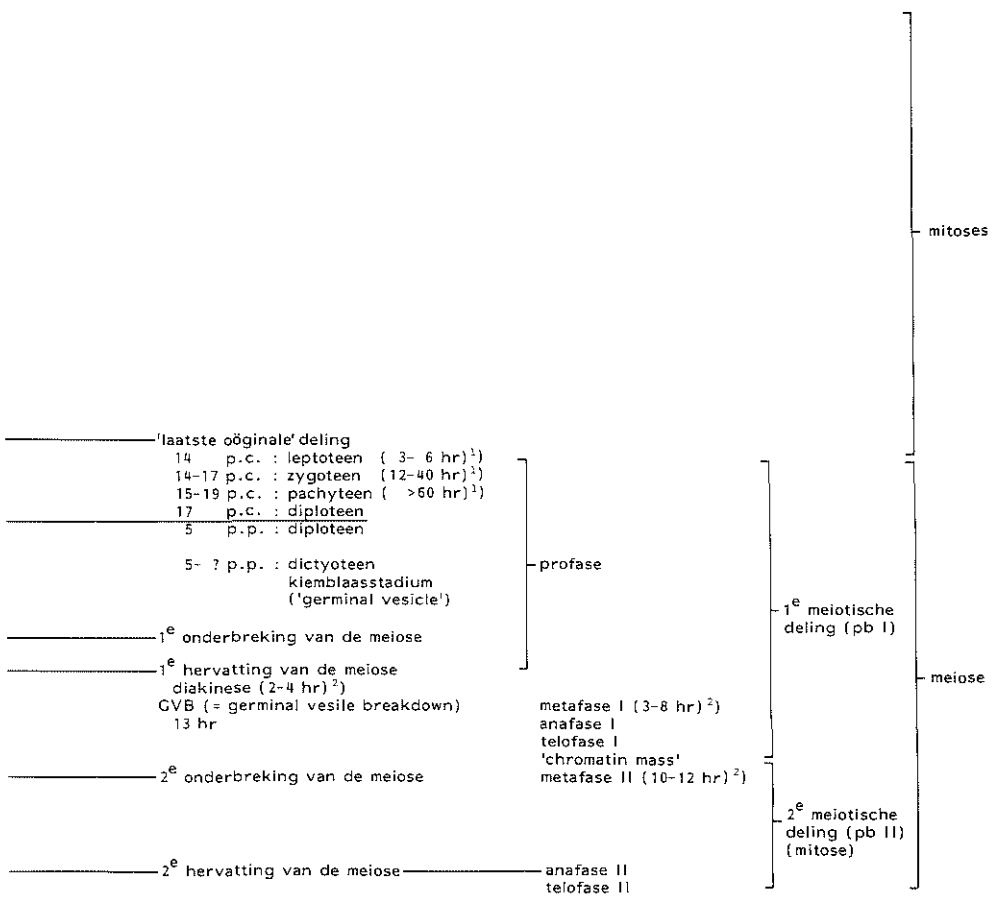
#### IV – 1.1 Ontstaan van primordiale geslachtscellen en oögonia

In figuur V wordt een kort overzicht gegeven van de verschillende ontwikkelingsstadia die onderscheiden kunnen worden bij het ontstaan van geslachtscellen. Tot het moment van de implantatie neemt het embryo niet in volume toe, doch vinden slechts klievingsdelingen plaats. Hierdoor ontstaan uit een enkele, aanvankelijk grote cel, een groot aantal kleinere cellen waarbij geen of zeer weinig nieuw protoplasma wordt gevormd. Na de implantatie begint het embryo snel te groeien. Met behulp van histochemische technieken en op morfologische gronden kan men reeds vanaf de achtste dag primitieve geslachtscellen aantonen (McKay et al., 1953; 1955; Pinkerton et al., 1961). Uit dit relatief kleine aantal stamcellen komen alle geslachtscellen voort. Zij worden primordiale geslachtscellen genoemd en bevinden zich aanvankelijk in het extra – embryonale endoderm, het dooierzakvlies.

Door een actief migratieproces, waarbij de pseudopodia van de primordiale geslachtscellen een grote rol spelen (Blandau et al., 1963), begeven de cellen zich naar het bindweefsel van de eindarm en uiteindelijk naar het gebied rond de zich ontwikkelende nieren. Daar dringen zij de primordiale gonaden binnen. Tijdens het migratieproces, dat plaatsvindt tussen dag 8 en 15 post coitum, nemen de primordiale geslachtscellen niet alleen in aantal maar ook in volume toe (Clark & Eddy, 1975 en Spiegelman & Bennett, 1973). In het begin van het migratieproces (dag 8) lopen de schattingen over het dan aanwezige aantal primordiale

FIGUUR V





<sup>1)</sup> Borum, 1961, 1966  
<sup>2)</sup> Crone et al, 1965  
<sup>3)</sup> Edwards, 1977  
<sup>4)</sup> Biggers & Powers, 1979  
<sup>5)</sup> Pedersen, 1972  
<sup>6)</sup> Peters et al, 1962

geslachtscellen in het muize – embryo uiteen van 20 – 100 (Clarke & Eddy, 1975), 75 – 100 (Mintz, 1957 en 1959) en 100 – 150 (Chiquoine, 1954). Op de twaalfde dag kan men ovaria en testes onderscheiden, het aantal primordiale geslachtscellen is dan toegenomen tot ca. 5.000. (Blandau et al., 1963).

In de vrouwelijke gonaden ontstaan uiteindelijk de oögonia. Deze cellen zijn groter dan de primordiale geslachtscellen en hebben een andere verdeling van cytoplasmatische organellen. In korte tijd neemt het aantal oögonia zeer sterk toe.

De terminologie voor de verschillende stadia van de oögenese, dat is de vorming, ontwikkeling en rijping van de vrouwelijke geslachtscel, wordt vaak verschillend en daardoor verwarrend gebruikt.

Ter verduidelijking volgen hieronder enige definities van de in dit proefschrift gehanteerde begrippen.

**Primordiale geslachtscellen** zijn de vroegst herkenbare geslachtscellen in een embryo. Het geslacht ervan is nog niet te onderscheiden. Zodra de gonade waarin deze geslachtscellen zich bevinden duidelijk herkenbaar is als ovarium worden deze cellen **oögonia** genoemd. De oögonia vermeerderen zich door mitoses. Wanneer de laatste oögoniale mitose heeft plaatsgevonden en de cel zich in de profase van de eerste meiotische deling bevindt ontstaat de **primaire oöcyt**. Na de afsnoering van het eerste poollichaampje tijdens het ovulatieproces in het volwassen dier begint de cel aan de tweede meiotische deling en ontstaat de **secundaire oöcyt** die zich in het metafase II stadium bevindt. Zodra de secundaire oöcyt vrij gekomen is uit het ovarium spreken we van **eicel of geövuleerde oöcyt**.

#### IV – 1.2 Oöcytrijping en follikelgroei

In de ovaria van pas geboren vrouwtjes heeft het overgrote deel van de oöcyten de profase van de meiose bijna voltooid en bevinden de oöcyten zich in het diptoteen stadium van de meiose. Hierna gaan de oöcyten over in een lange "rust – fase", het 'dictyoteen' stadium. Wel groeien zij nog in volume doch de meiose staat stil. Bovendien worden zij door een enkele laag afgeplatte epitheelcellen omgeven waarna men spreekt van een primordiale follikel. Ongeveer 90% van de oöcyten in ovaria van volwassen vrouwtjes bevindt zich in dit stadium, de overige 10% groeit (Baker, 1972). Het aantal zich verder ontwikkelende follikels is onder andere afhankelijk van de leeftijd van het dier, (Jones & Krohn, 1961), van het aantal zich reeds verder ontwikkelende follikels (Krarup, Pedersen & Faber, 1969) en waarschijnlijk afhankelijk van de hormonale stimulatie. De eerste tekenen hiervan zijn een nog verdere toename van de oöcytgrootte en een opvallende verandering in de verdeling en aantallen cytoplasmatische organellen. Daarna treedt een vermenigvuldiging van de omringende granulosacellen en de vorming van de zona pellucida op. Dit is een laag van mucoproteïnen welke rond de oöcyt ontstaat. Door verdere deling van de omringende laag granulosacellen wordt de zogenaamde membrana granulosa meerlagig en dringen bloedcapillairen door de rond de follikel



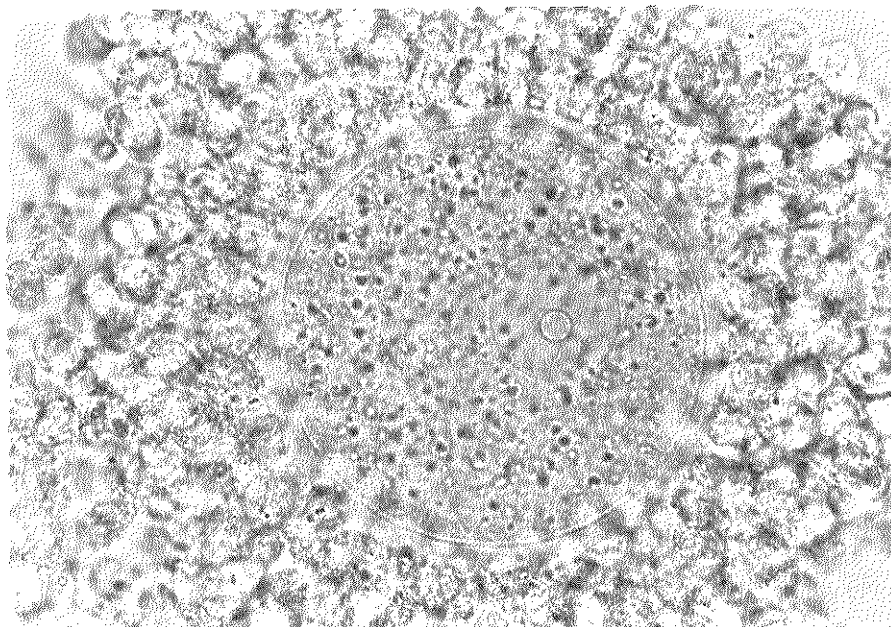


FOTO 6

Foto 6 geeft het beeld van een primaire oöcyt. De oöcyt is omgeven door een compacte massa cumuluscellen. Binnen de oöcyt is het kiemblaasje (germinal vesicle) met daarin de nucleolus duidelijk zichtbaar (mikroskoopvergroting 40x1,25).

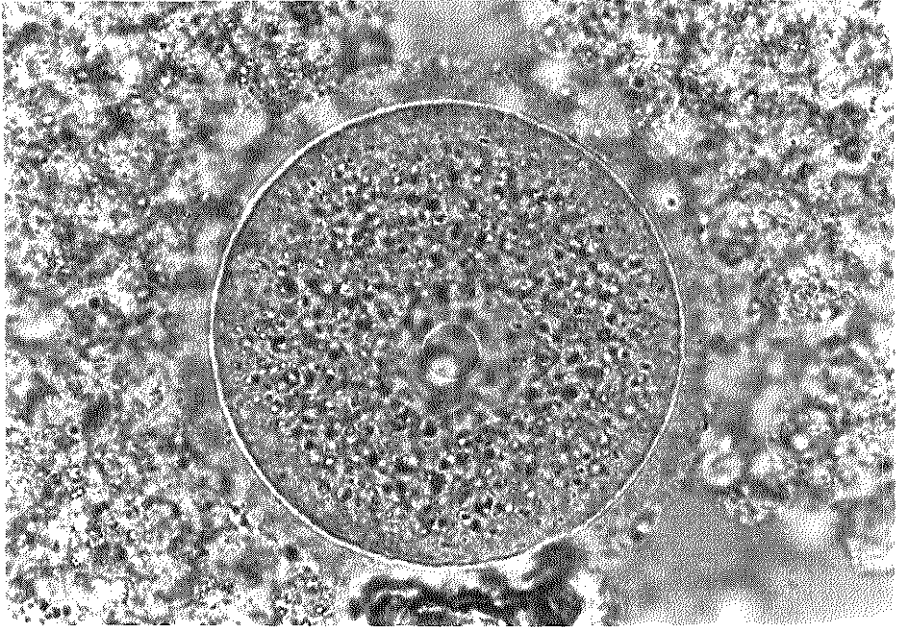


FOTO 7

Foto 7 illustreert de hervatting van de meiose na het kiemblaasstadium. Vergeleken met het beeld van foto 6 is duidelijk te zien dat de kernmembraan reeds is opgelost (mikroskoopvergroting 40x1,6).

liggende fibroblasten ("theca externa") heen en vormen hieronder een vasculaire laag, de "theca interna". In cyclische muizen ontwikkelen slechts die follikels zich verder indien zij dit stadium bereikt hebben op metoestrus. Alle follikels die dit stadium op een ander moment van de cyclus bereiken degenereren (Pedersen, 1970). Voortgezette groei bestaat uit een toename van het aantal granulosa-cellen en opname van vloeistof ("liquor folliculi") tussen deze cellen. De hoeveelheid vloeistof neemt constant toe en beslaat een steeds grotere ruimte in de follikel. Wanneer er een duidelijke grote holte gevormd is spreekt men van een "Graafse follikel", genoemd naar de Nederlander Reijnier de Graaf (1641 – 1673) die deze follikels voor het eerst beschreven heeft. De factoren die de primordiale follikels selecteren tot verdere ontwikkeling zijn nog steeds onbekend. Voordat ovulatie kan optreden moet de Graafse follikel nog een verdere pre-ovulatoire rijping ondergaan die plaatsvindt onder nauwkeurig bepaalde hormonale condities.

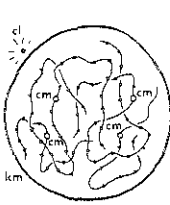
Een onderdeel van deze verdere follikel – rijping is de voltooiing van de meiose. De oöcyten, welke zich in de beginfase van de Graafse follikel nog in het dictyoteen (zie foto's 6 en 7) bevonden, hervatten de meiose onder invloed van de ovulatie – inducerende LH – piek. Na de afsnoering van het eerste poollichaampje wordt de oöcytrijping voltooid door middel van de tweede meiotische deling welke tot het metafase II stadium plaatsvindt. De secundaire oöcyten bevinden zich ten tijde van de follikelsprong in dit stadium. (Zie ook IV – 1.4)

#### IV – 1.3 De meiose; vorming van primaire en secundaire oöcyten

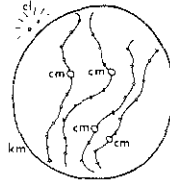
De meiose (reductiedeling) welke bij de vorming van de vrouwelijke en mannelijke geslachtscellen plaatsvindt, omvat twee celdelingen. Figuur III geeft een schematisch overzicht van de morfologie van de chromosomen tijdens deze twee delingen terwijl in figuur V onder andere de tijdsduur van de te onderscheiden stadia van de meiose zijn opgenomen. Tijdens de eerste deling wordt het chromosoomaantal gehalveerd en treedt uitwisseling van genetische informatie op tussen homologe chromosomenparen. Per paar is steeds één chromosoom van de vader afkomstig terwijl het andere homologe chromosoom van de moeder komt. De tweede meiotische deling lijkt op een mitose met dien verstande dat er slechts een haploïd aantal chromosomen bij betrokken is. De meiose is van grote biologische betekenis. Zoals reeds gememoreerd is tijdens deze delingen recombinatie van eigenschappen mogelijk waardoor genetisch verschillende geslachtscellen ontstaan. Hierdoor is een sterk gevarieerd nakomelingschap mogelijk en kan natuurlijke selectie optreden. De meiose bestaat uit twee opeenvolgende delingen.

In de oögenia, evenals in alle andere somatische cellen, komen twee groepen morfologisch gelijke, doch qua genetische eigenschappen meestal verschillende

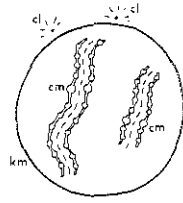
FIGUUR III  
DE MEIOSE:



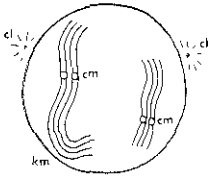
I (leptoteen)



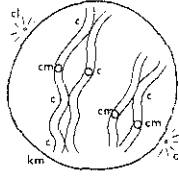
II (zygoteen)



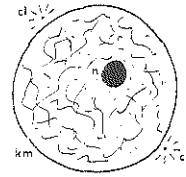
III (pachyteen)



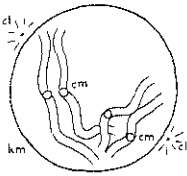
IV (laat pachyteen)



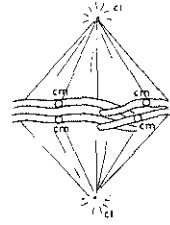
V (diptoteen)



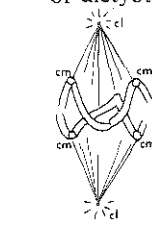
VI (laat diptoteen  
of dictyoteen)



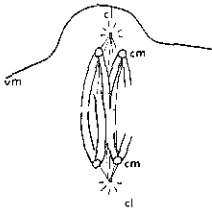
VII (diakinese)



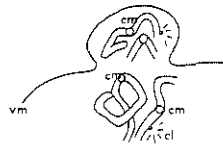
VIII (metafase I)



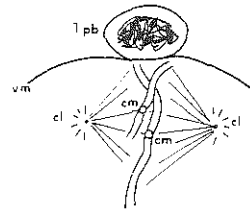
IX (anafase I)



X (late anafase I)



XI (telofase)



XII (metafase II)

cl = centraallichaampje of centriool  
 cm = centromeer  
 c = chiasmata of uitwisselingspunten  
 km = kernmembraan  
 vm = vitellinemembraan of eicelmembraan  
 n = nucleolus  
 lpb = eerste poollichaampje

### FIGUUR III

Figuur III is een schematische weergave van de meiose of reductiedeling van een zoogdier-eicel. Ten behoeve van de overzichtelijkheid zijn in het schema slechts twee paren chromosomen opgenomen terwijl uitsluitend de kernen zijn weergegeven en de rest van de eicel, het cytoplasma en de eicelmembraan, buiten beschouwing is gelaten.

- I. Leptoteen: de chromosomen worden zichtbaar onder de mikroskoop als lange dunne "kralensnoeren".
- II. Zygoteen: de homologe chromosomen begeven zich naar elkaar toe.
- III. Pachyteen: paring van de homologe chromosomen.
- IV. Laat-pachyteen: de hechte paring van de homologe chromosomen is voltooid en er vindt overlangse splijting van de chromosomen plaats waardoor het vierstrengenstadium ontstaat, de zogenaamde tetraade. De vier strengen breken en herenigen zich gedurende het spiraliseren en er vindt op deze wijze uitwisseling plaats van gedeelten van twee homologe chromosomen. Het betreft hier dus uitwisseling van genetisch materiaal afkomstig van de moeder met dat van de vader.
- V. Diploteen: de chromosomen raken weer los van elkaar maar blijven op bepaalde plaatsen, waar uitwisseling van delen van homologe chromosomen plaats vindt, de chiasmata, met elkaar verbonden.
- VI. Laat-diploteen: (ook wel dictyoteen) na het begin van het diploteen gaat de oocyt over in een langdurig ruststadium, dat wil zeggen dat de meiose stil staat. Tijdens dit stadium is de kern diffuus en zijn de chromosomen niet meer te onderscheiden. De laatste fase van het laat-diploteen wordt ook wel het kiemblaasstadium genoemd (germinal vesicle stage).
- VII. Diakinese: inkorting en verdikking van de chromosomen.
- VIII. Metafase-I: opbouw van de kernspoel, afbraak van de kernmembraan en rangschikking van de maximaal gecontraheerde chromosomen in het equatoriale vlak van de kernspoel.
- IX. Anafase-I: migratie van de homologe chromosomen naar de twee polen met behulp van de glij- en trekdraden van de kernspoel.
- X. Late-anafase-I: bijna voltooide migratie van de chromosomen.
- XI. Telofase: voltooide scheiding van de beide homologe groepen chromosomen: een groep vormt het eerste poollichaampje en de andere groep blijft in de oöcyt achter.
- XII. Metafase II: opbouw van de tweede kernspoel en rangschikking van de in de oöcyt achtergebleven groep chromosomen in het equatoriale vlak van de kernspoel.

chromosomen voor: een groep afkomstig van de moeder en een groep afkomstig van de vader van het individu.

Na de telofase van de laatste (mitotische) oögoniale deling gaan de primaire oöcyten over in de korte interfase. Tijdens deze fase is de kern diffuus en zijn soms korte stukjes chromosomale draden zichtbaar: het preleptoteen (Baker, 1963; 1966). Gedurende deze fase synthetiseert de cel DNA als voorbereiding voor de meiose (Sirlin & Edwards, 1959; Rudkin & Griech, 1962; Crone et al, 1965). Tijdens het leptoteen worden de chromosomen in de kern zichtbaar als lange, dunne draden welke qua vorm enige overeenkomst vertonen met een kralensnoer. Het leptoteen is het eerste gedeelte van de profase van de eerste meiotische deling. Gedurende het hierop volgende zygoten gebeven de homologe chromosomen zich naar elkaar toe, een proces dat tijdens het pachyteen voltooid wordt. Tevens vindt een continue verkorting en verdikking van de chromosomen plaats. Na de hechte paring in het pachyteen wordt de binding in het diploten weer losser en vindt een overlangse splijting plaats waarna de individuele chromosomen uit twee identieke chromatiden bestaan, echter met een gezamenlijke centromeer. Doordat de homologe chromosomen nog gepaard zijn spreken we wel van het "vierstrengen stadium" of van een tetra. Tijdens dit stadium manifesteert zich de onderlinge uitwisseling van bepaalde stukken chromatiden van twee homologe chromosomen. Dit noemt men het "uitwisselingsproces" of "crossing over". Hierdoor worden de eigenschappen welke op homologe chromosomen van de moeder en van de vader liggen uitgewisseld en dus met elkaar vermengd. Dit zogenaamde "dictyoteen" stadium is reeds kort na de geboorte van het dier bereikt en duurt tot aan de hervatting van de meiose tijdens het ovulatieproces. De voortgang van de meiose wordt in deze fase dus voor lange tijd onderbroken, dit in tegenstelling tot de meiose in de testis. Tijdens het dictyoteen zijn, vooral bij ratte – en muize – oöcyten, de chromosomen zeer diffuus verspreid en moeilijk te onderscheiden (Beaumont & Mandl, 1962; Franchi & Mandl, 1962; Tsuda, 1965). De oöcyten bevatten dan de zogenaamde "lampenborstel" chromosomen ("lampbrush type chromosomes") welke op zeer veel plaatsen lange laterale lussen gevormd hebben. Hierdoor wordt het diffuse aspect van de kern veroorzaakt. (Mandl, 1963). Dit zeer diffuse karakter verandert pas doordat in iedere oestruscyclus een bepaalde populatie primordiale follikels onder invloed van FSH gestimuleerd wordt tot verdere ontwikkeling. Pas nadat deze groei gevorderd is tot het stadium van een "Graafse – follikel" wordt de meiose in de oöcyt hervat onder invloed van de ovulatie – inducerende LH piek. Dan treedt tijdens de diakinese, het zgn. kiemblaasstadium, verdere verkorting van de chromosomen op, verdwijnen de laterale lussen en wordt de kernmembraan afgebroken (Donahue, 1968). Tussen de twee dochtercentrosomen van het inmiddels gedeelde centrosoom wordt een kernspoel gevormd. De chromosomen ( $2n$ ) rangschikken zich nu in het equatoriale vlak van de kernspoel, zij zijn maximaal gecontraheerd en vormen het metafase I stadium. In de kernspoel bevinden zich "glij – en trekdraden". Met behulp hiervan wordt van ieder paar homologe chromosomen een chromosoom naar de beide polen getrokken. Dit proces gebeurt

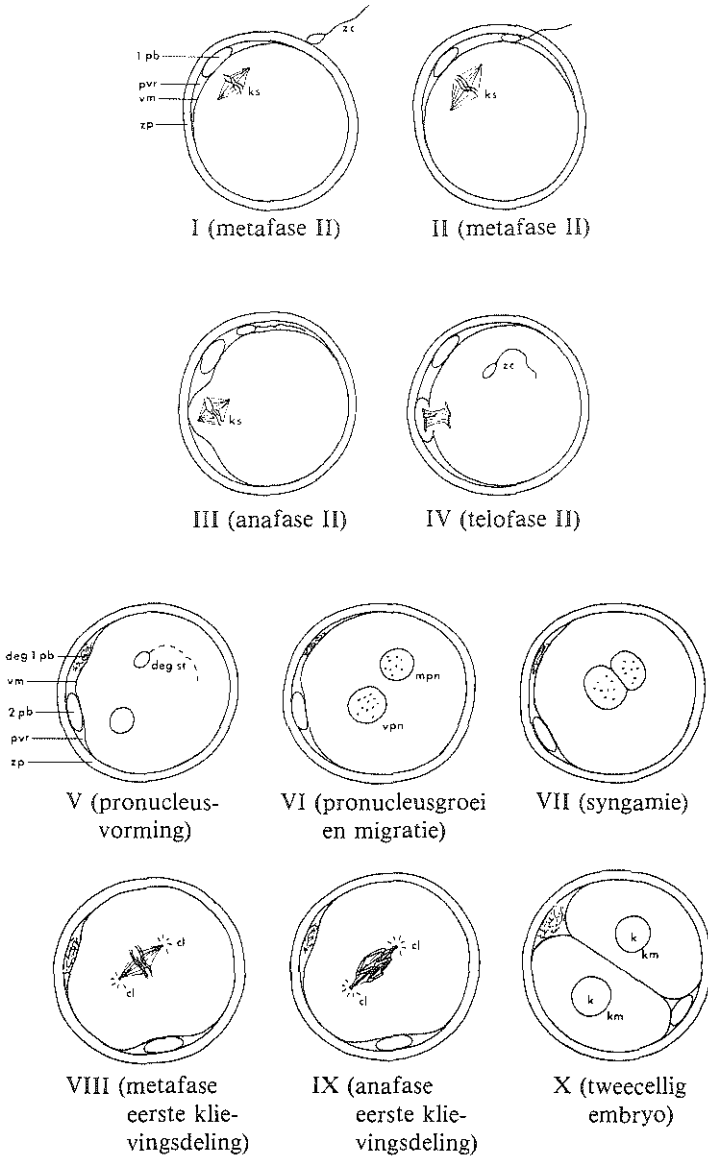
tijdens de anafase. Een set wordt dan met zeer weinig cytoplasma als het ware buiten de cel gestoten in het eerste poollichaampje. Dit poollichaampje degenerereert en heeft geen verdere fysiologische betekenis. De eicel bevat nu nog maar een stel dubbelstrengige chromosomen en is dus haploïd ( $n$ ). Deze chromosomen condenseren en vormen een vrij compacte massa aan de oppervlakte van de oöcyt. Men spreekt van het "chromatine massa II stadium" ("chromatin mass stage") (Vermeiden, 1974). Kort hierna begint de nu secundaire oöcyt aan de tweede meiotische deling en wordt een kernspoel met een metafaseplaat gevormd. In dit stadium, het metafase II stadium, bevindt de secundaire oöcyt zich ten tijde van de follikelsprong. Het is echter bekend dat het overgrote deel van de oöcyten in groeiende follikels niet tot volledige rijping komt. Deze follikels verliezen voortijdig reeds hun samenhang waardoor de oöcytrijping, (de voortzetting van de meiose), wordt geblokkeerd of ontremd en de follikel niet tot ovulatie komt (Byskov, 1978; Peters, 1979). Na de follikelsprong wordt de meiose wederom voor onbepaalde tijd onderbroken. Zij wordt pas hervat na een prikkel welke onder normale omstandigheden gegeven wordt door de binnendringende zaadcel tijdens de bevruchting. Ook kan de meiose worden hervat indien de eicel wordt gestimuleerd tot een parthenogenetische ontwikkeling. Bij in vitro rijpende ratte-oöcyten vindt eveneens afsnoering van het tweede poollichaampje plaats (Zeilmaker & Verhamme, 1976).

#### IV-1.4 Ovulatie

Ovulatie is het proces waarbij de follikelwand aan de buitenzijde van het ovarium open breekt en de follikel - inhoud, de eicel met omringende cumuluscellen en follikelvloeistof, naar buiten komt. Het moment van ovulatie hangt nauw samen met verschillende hormoonspiegels waarbij vooral de concentratie van LH van groot belang is. Na de zogenaamde "LH - piek" neemt de colloïdale osmotische druk van de follikelvloeistof toe en vindt men bij de follikelwand een verhoogde activiteit van proteolytische enzymen.

Bij de muis komen er per ovulatie, welke gelijktijdig in beide ovaria plaatsvindt, totaal 8 - 12 eicellen vrij. De eicellen zijn omgeven door kleverige cumuluscellen waardoor ze als regel een klonterige celmassa vormen wanneer ze in het oviduct zijn beland. Bij de muis wordt het transport van de eicellen naar het oviduct vereenvoudigd door een vlies rond het ovarium, bursa, dat met een kleine opening verbonden is met het oviduct. De bursa sluit tevens een abdominale zwangerschap uit doordat zij voorkomt dat eicellen per ongeluk in de buikholte terecht komen (Gwatkin, 1977; Blandau, 1969).

FIGUUR IV  
DE BEVRUCHTING:





## FIGUUR IV

Figuur IV is een schematische weergave van de bevruchting van een zoogdier-eicel. Ten behoeve van de overzichtelijkheid zijn in het schema de cumulus-cellen buiten beschouwing gelaten.

- I. Metafase II: eerste contact van de kop van een zaadcel met de zona pellucida.
- II. Metafase II: de kop van de zaadcel is door de zona pellucida gedrongen en bevindt zich in de perivitelline ruimte; de staart van de zaadcel bevindt zich gedeeltelijk nog buiten de eicel.
- III. Anafase II: het binnendringen van de zaadcel activeert de eicel tot voltooiing van de meiose: rotatie van de kernspoel en splijting van de centromeren en migratie van de twee centromeerhelften naar de polen van de kernspoel. De zaadcel begeeft zich van de perivitelline ruimte via de vitelline membraan (eicelmembraan) in het cytoplasma.
- IV. Telofase II: voltooide scheiding van de chromosomen en afsnoering van het tweede poollichaampje.
- V. Pronucleusvorming: het tweede poollichaampje is geheel afgesplitst, het eerste poollichaampje degenerereert evenals de staart van de zaadcel. De kop van de zaadcel en de in de eicel achtergebleven chromosomen transformeren zich tot respectievelijk de mannelijke- en de vrouwelijke voorkern (pronucleus).
- IV. Pronucleusgroei: de beide voorkernen begeven zich naar het midden van de eicel en nemen iets in volume toe.
- VII. Syngamie: de voorkernen liggen in het midden van het cytoplasma tegen elkaar aan, de chromosomen worden korter en dikker.
- VIII. Metafase: de maximaal gecontraheerde chromosomen uit beide pronuclei bevinden zich in het equatoriale vlak van de kernspoel.
- IX. Anafase: de gespleten centromeren en de daaraan verbonden chromosoomstrengen worden met behulp van de glij- en trekdraden van de kernspoel naar de beide polen getrokken.
- X. Twee-cellig embryo: de eerste klievingsdeling van de bevruchte eicel is voltooid. In beide kernen bevinden zich zowel het genetisch materiaal van de eicel als het genetisch materiaal van de zaadcel zodat een gemengde expressie van de genetische eigenschappen van de vader en de moeder mogelijk is geworden.

#### IV – 1.5 De bevruchting

De bevruchting vindt gewoonlijk in het ampullaire deel van de beide eileiders plaats. Hoewel slechts relatief weinig spermatozoa deze plaats bereiken, kan men er soms reeds 15 minuten na de ejaculatie spermatozoa aantreffen (Blandau, 1969). Spermatozoa die de ampulla bereiken behouden de mogelijkheid tot bevruchten gedurende ongeveer zes uur (Austin, 1974). Na ongeveer twee uur hebben de spermatozoa de massa cumuluscellen doordrongen en de eicel bereikt waarna penetratie van de eicelmembraan kan optreden. Hoewel meerdere spermatozoa de perivitelline ruimte kunnen binnen treden, fuseert als regel slechts een zaadcel met de eicelmembraan. De mogelijke mechanismen welke de doordringing van de eicelmembraan door meerdere zaadcellen voorkomen worden later in hoofdstuk VIII – 1 besproken. In figuur IV is een schematisch overzicht gegeven van de bevruchting, vanaf het eerste contact van de zaadcel met de eicel (de zona pellucida) tot en met de eerste klievingsdeling. Terwille van de overzichtelijkheid zijn de cumuluscellen niet in deze figuur opgenomen en verder buiten beschouwing gelaten. In de oöcyt wordt de tweede meiotische deling, welke ten tijde van de ovulatie het metafase II stadium had bereikt, na het binnendringen van de zaadcel voltooid. Ook nu vindt er een ongelijke celdeling plaats en ontstaat het tweede poollichaampje dat twee tot drie uur na het binnendringen van de zaadcel is afgesnoerd. Ongeveer twee uur later is de in de eicel achtergebleven gehalveerde hoeveelheid vrouwelijk genetisch materiaal getransformeerd tot een vrouwelijke (haploïde) pronucleus terwijl uit de binnengedrongen zaadcel de mannelijke pronucleus ontstaat. De twee pronuclei nemen in volume toe en migreren naar het centrum van de eicel. Tijdens deze periode wordt de hoeveelheid DNA verdubbeld. De kernmembranen lossen op en de chromosomen condenseren verder en rangschikken zich in het equatoriale vlak van de gezamenlijke kernspool, waarna de eerste klievingsdeling plaatsvindt. Pas na deze deling, dus vanaf het tweecellig stadium, bevinden de chromosomen, afkomstig van de beide ouders, zich gezamenlijk in een celkern.

#### IV – 1.6 Pre – implantatie ontwikkeling

Gedurende de periode tussen de bevruchting en de eerste klievingsdeling, welke 18 – 20 uur na de bevruchting plaatsvindt, verliest de zygote (bevruchte eicel) geleidelijk al zijn omringende cumuluscellen. Vijfendertig tot achtenveertig uur na bevruchting heeft het embryo het 4 – cellig stadium bereikt, terwijl het nog eens 20 uur later 16 – cellig is.

Tussen het 8 – en 16 – cellig stadium treedt meestal compactie op, de onderlinge celgrenzen vervagen en zijn later niet meer te onderscheiden. Men spreekt dan van het morula – stadium en over morula's. Dit stadium wordt ongeveer 60 uur na de bevruchting bereikt. Ongeveer 10 uur later heeft het embryo het gehele traject door het oviduct afgelegd en komt het in de uterus. Het is echter bekend dat er grote

verschillen zijn in het tijdstip waarop het embryo de uterus binnenkomt. Kort na dit moment, meestal iets voorbij het 32-cellig stadium, verschijnt er een excentrische, met vloeistof gevulde holte tussen de cellen en vanaf dit moment spreken we over het blastocyst – stadium of over een blastula. Deze holte neemt vrij snel in volume toe en vormt de zogenaamde blastocoel die door een enkele cellaag is omgeven. Op één plaats bevindt zich een groepje cellen, de zogenaamde embryoblast, waaruit het eigenlijke embryo ontstaat. Door nog onbekende oorzaken verdwijnt de zona pellucida en hecht de blastocyst zich vast aan het endometrium epitheel. Dit proces, implantatie, gebeurt gewoonlijk ongeveer 100 uur na de bevruchting en markeert het einde van de pre – implantatie ontwikkeling. Na de implantatie begint een complexe interactie tussen het endometrium epitheel en het embryo.

#### **IV – 1.7 Zwangerschap en pseudozwangerschap**

Wanneer copulatie heeft plaatsgevonden (te constateren door het waarnemen van de zogenaamde vaginale prop, zie ook IV – 2.4) kan bevruchting optreden. De secretie van progesteron door de corpora – lutea welke noodzakelijk is voor het goede verloop van de zwangerschap, wordt op gang gebracht doordat de copulatie – stimulus de hypofyse tot prolactine – afgifte aanzet. Wanneer copulatie met een gevasectomeerd mannetje plaatsvindt of wanneer om andere redenen geen bevruchting plaats heeft gevonden resulteert de mechanische stimulatie van de cervix uteri in een zogenaamde "pseudozwangerschap". De eicellen van deze vrouwtjes zijn dus niet bevrucht doch de hormonale aspecten van de vroege zwangerschap zijn wel geïnduceerd. Deze fase duurt in het geval van pseudozwangerschap 11 dagen. Dit maakt deze dieren geschikt als recipiënt voor embryo-transplantatie – experimenten. Getransplanteerde embryo's zorgen 1 – 2 dagen na de implantatie door hun endocriene activiteit voor een verdere activatie van de corpora lutea gedurende de rest van de zwangerschap. De zwangerschapsduur bedraagt 20 dagen.

#### **IV – 1.8 Oestrus – cyclus**

Volwassen vrouwelijke muizen, die in kleine aantallen in een kooi gehouden worden hebben doorgaans een vier – of vijfdaagse oestrus – (ovulatie) cyclus. Aan de hand van veranderingen die optreden in het overheersende celtype in de oppervlakkige laag van de wand van de vagina kan men bij onder andere de muis en de rat vrij gemakkelijk het stadium van de cyclus bepalen waarin een dier zich bevindt. Men kan deze stadia vrij eenvoudig bepalen in bijvoorbeeld mikrosopisch onderzoek van zogenaamde vaginaal uitstijpjes (Long & Evans, 1922; Mandl, 1951; Orsini,

1961; Bingel & Schwartz, 1969). Men onderscheidt de volgende stadia: oestrus, metoestrus, dioestrus en pro – oestrus. Nauw met deze cyclus samenhangend is het voortplantingsgedrag. Gedurende een periode van ongeveer 3 uur in de nacht waarin ovulatie optreedt tussen pro – oestrus en oestrus zijn de vrouwtjes receptief, dat wil zeggen accepteren zij een mannetje en vindt als regel copulatie plaats waarna corpus – luteum – aktivatie plaatsvindt en bevruchting van de eicellen. Voorafgaande aan de ovulatie vinden follikelgroei en oöcytrijping in het ovarium plaats. Wanneer men de dieren in grotere groepen bijeen houdt raakt de cyclus vaak verstoord en wordt bij ongeveer 80% van de dieren pseudozwangerschap geïnduceerd. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door verhoogde FSH – en Prolactinesecretie in combinatie met de aanwezigheid van geactiveerde corpora lutea (Ryan & Schwartz, 1977). De aktivering van deze corpora lutea zou het gevolg zijn van het in groepen huisvesten van muizen. Reukprikkelers zouden tot zogenaamde spontane pseudozwangerschap leiden: het van der Lee – Boot effect. (Van der Lee & Boot, 1956) (IV – 1.2) Plaatst men dieren uit deze bakken in groepjes van drie bij een mannetje dan initieert dit de oestruscyclus met als resultaat dat de meeste vaginale proppen (zie IV – 2.4) gevonden worden op de derde dag na het bij elkaar brengen van de vrouwtjes en mannetjes. Dit wordt wel het zogenaamde "Whitten effect" genoemd. Whitten (1956) concludeert dat dit effect veroorzaakt zou worden door reukprikkelers welke van het mannetje afkomstig zouden zijn.

## **IV – 2    Materiaal en methoden**

### **IV – 2.1    Proefdieren**

In alle beschreven experimenten waren de gameten afkomstig van F – 1 hybride muizen van de kruising C57BL6J x CBA en de reciproke kruising. Tenzij nadrukkelijk anders vermeld zullen in het vervolg dan ook steeds deze muizen worden bedoeld. Teneinde pseudo – zwangere vrouwtjes te verkrijgen voor embryotransplantaties werden gevasectomeerde Swiss muizen gebruikt (zie IV – 2.5).

#### IV – 2.2 Huisvesting proefdieren

De dieren werden in geconditioneerde ruimten gehouden waar een constante temperatuur van 20 graden Celsius heerste. Een 14 – uur lange lichtperiode werd steeds afgewisseld door een 10 – uur durende donkerperiode van 19.00 uur tot 0.500 uur. Drinken en eten (stukjes samengeperst "volledige laboratorium voeders" voor rat, hamster en muis; Hope farms, Woerden) ad libitum. Mannetjes en vrouwtjes die niet direkt voor experimenten nodig waren werden apart in groepen van maximaal 20 in doorzichtige plastic voorraadbakken van 40 x 25 x 15 cm gehuisvest. Mannetjes die voor experimenten gebruikt werden, bevonden zich in doorzichtige plastic kooien van 18 x 12 x 12 cm. Eenmaal hierin, bleven zij apart in deze geplaatst om later vechten met andere mannetjes te voorkomen. Ook pseudozwangere vrouwtjes die als recipiënt in transplantatiestudies fungeerden werden in deze kleinere kooien geplaatst, maximaal drie in een bakje. In de bakken werd steeds een laag zaagsel van circa 1 cm. aangebracht De dieren werden tenminste een keer per week in schone gesteriliseerde bakken met zaagsel overgeplaatst.

#### IV – 2.3 Kweek – medium

In alle hier beschreven experimenten werd het medium gebruikt zoals dat door Whitten (Whitten, 1971) is beschreven. Steeds werd 100 ml. gemaakt; bij gering gebruik werd iedere week vers medium gemaakt.

Honderd ml. medium werd als volgt bereid:

NaCl	(Merck, art. 6329)	514,0 mg
KCl	(Merck, art. 4933)	35,6 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Merck, art. 4873)	16,2 mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	(Merck, art. 5886)	29,4 mg
NaHCO <sub>3</sub>	(Merck, art. 6329)	190,0 mg
D(+) – Glucose	(Merck, art. 8337)	100,0 mg
Natrium – DL – lactat purum	(Fluka, AG, Buchs SG)	222,0 mg
Ca – lactate (L).5H <sub>2</sub> O	(Schwarz – Mann Res.)	527,0 mg
Na – pyruvaat	(Merck, art. 6619)	2,5 mg
Penicilline G.	(Specia – Paris)	500,0 IE
Streptomycine – sulfaat	(Specia – Paris)	500,0 mg

Deze chemicaliën werden met tridest aangevuld tot circa 90 ml. en geschud tot een heldere oplossing was ontstaan. Daarna werd 0,1 ml. 1% phenol rood oplossing toegevoegd en het volume met tridest tot precies 100 ml. aangevuld. Vervolgens werd de oplossing gedurende 5 – 10 minuten doorgast met een gasmengsel bestaande uit 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> en 90% N<sub>2</sub> en bewaard bij circa 4 graden Celsius. Vlak voor het gebruik werd 10 ml. van deze voorraad wederom doorgast en werd 30 mg. runder albumine (Bovine Albumine Fraction V, powder, Fluka AG, Buchs SG) toegevoegd waarna de oplossing door een 45 mu filter (Swinnex – 13 filter unit, Millipore S.A.) werd gefiltreerd. De eerste 5 ml. medium welke het filter had doorgelaten werd niet gebruikt, zodat eventueel in het filter aanwezige oplosbare toxische stoffen werden geëlimineerd. Na filtratie werd een gasfase van 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> en 90% N<sub>2</sub> boven het medium aangebracht en werd het buisje met een schroefdop luchtdicht afgesloten.

#### **IV – 2.4 Detectie van spontane ovulatie**

Op de middag, voorafgaande aan de dag waarop eicellen voor experimenten nodig waren, werden groepjes van drie (C57BL 6J(CBA) F1 vrouwtjes bij gevasectomeerde Swiss mannetjes geplaatst. Deze vrouwtjes werden de volgende morgen onderzocht op de aanwezigheid van een vaginale prop hetgeen een vrij zekere indicatie is dat er ovulatie heeft plaatsgevonden. Deze vaginale proppen worden gevormd door een mengsel van secreties van de zaadblaas, prostraat en coagulatie klier van het mannetje. De proppen blijven ongeveer 16 – 24 uur aanwezig. Onder de gegeven omstandigheden (zie IV – 2.2) treedt ovulatie tussen 03.00 en 08.00 uur op; bij de meeste dieren tussen 03.00 en 05.00 uur. (Bingel, 1974 en Braden, 1957). Op grond van deze gegevens werd er bij de berekeningen van de "post – ovulatoire leeftijd" van de eicellen van uitgegaan dat de ovulatie om 05.00 uur had plaatsgevonden.

#### **IV – 2.5 Inductie van super – ovulatie**

Acht tot twintig weken oude (C57BL 6JXCBA) F1 vrouwtjes werden met behulp van twee intraperitoneale injecties gestimuleerd tot "super – ovulatie". Na een eerste injectie met 5 I.E. PMS (Gestyl, Organon – Oss) werd 44 – 46 uur later een volgende injectie met 5 I.E. HCG (Pregnyl, Organon – Oss) gegeven. Per ovulatie, welke ongeveer 12 uur na de HCG injectie plaatsvindt, komen, afhankelijk van de leeftijd van het vrouwtje, 20 – 50 eicellen vrij.

#### IV – 2.6 Eicel – isolatie

Tussen 09.00 en 10.30 werden de vrouwtjes door cervicale dislocatie gedood (bij de geïnduceerde ovulaties 20 – 22 uur na de HCG injectie) en werden de oviducten verwijderd. In een horlogeglas met medium werden de oviducten onder een binoculaire (Zeiss) geplaatst. De eicellen werden geïsoleerd door de wand van het oviduct ter plaatse van de zwelling met een injectienaald en een pincet open te "scheuren". Door de lokale overdruk in het oviduct komen de eicellen met de omringende cumuluscellen spontaan naar buiten. Door het kleverige karakter van de cumuluscellen zitten de eicellen meestal in een compacte klont cumuluscellen. Hierna werden de eicellen voor verschillende doeleinden verder gemanipuleerd.

#### IV – 2.7 Manipulatie van eicellen en embryo's

Een geïsoleerde groep eicellen met de omringende cumuluscellen werd in een glazen micropipet, binnenste diameter circa 600  $\mu$  – meter, opgezogen en overgebracht in een druppel medium. Kale eicellen, dat wil zeggen eicellen zonder cumuluscellen en andere preïmplantatie stadia werden op dezelfde wijze van het ene medium naar het andere overgebracht. In dit geval worden pipetjes met een binnenste diameter van 100 – 200  $\mu$  – meter gebruikt. Deze manipulaties werden onder 40 of 100x vergroting op een omkeermicroscop (Olympus CK) uitgevoerd.

#### IV – 2.8 Anesthesie

Muizen werden verdoofd met een intraperitoneale injectie met 0,02 ml. avertine – oplossing per gram lichaamsgewicht. De avertine – oplossing werd verkregen door onverdunde avertine 50 x te verdunnen met fysiologisch zout. Om goed oplossen te bewerkstelligen werd de oplossing tot ongeveer 65 graden Celsius verwarmd.

#### IV – 2.9 Vasectomie

Acht tot twaalf weken oude Swiss mannetjes werden onder avertine – verdoving bilateraal gevasectomeerd. Na een 1 – 1,5 cm. lange incisie in de mediaan van de centrale abdominale lichaamswand werden twee ligaturen rond de beide vasa deferenti op circa 1 cm. afstand aangebracht en een tussenliggend gedeelte van circa 0,5 cm. verwijderd. Na een herstelperiode van twee weken werden bij ieder gevasectomeerd mannetje drie volwassen vrouwtjes geplaatst. Deze vrouwtjes

werden gedurende 4 weken gecontroleerd op eventuele zwangerschap en vervolgens van de mannetjes verwijderd. Na deze controle op steriliteit konden de mannetjes voor experimenten gebruikt worden. Zij zullen in het vervolg kortweg aangeduid worden als gevasectomeerde mannetjes.

#### **IV – 2.10 Kweekomstandigheden**

Incubatie en kweek van vroege parthenogenonten en (preimplantatie) embryo's geschiedde in druppels van 0.2 cc medium welke in een kweekbakje (Falcon tissue culture dish, ref. 3001F, 35 x 10 mm) waren aangebracht. De kweekbakjes werden vervolgens met paraffine – olie (Paraffine, liquid; Baker Chemicals BV, Holland) gevuld zodanig dat de druppel geheel door olie was bedekt. De olie was met een fysiologische zoutoplossing verzadigd en voorverwarmd tot 37 graden Celsius. Vervolgens werden de kweekbakjes op een verwarmd plateau geplaatst.

Dit plateau werd door een gethermostreerd (37,5 graden Celsius) circulerend warm watersysteem (Paratherm U 5 electronic) op constante temperatuur gehouden en was geplaatst op een schudtafel (GFL). Met een gloeiende injectienaald werd een gaatje in het deksel van het kweekbakje gebrand. Hierdoor werd een slangetje aangebracht waardoor een constante aanvoer van een gasmengsel (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> en 90% N<sub>2</sub>) in de ruimte boven de olie plaatsvond. Om verdamping van het medium door de paraffine – olie te voorkomen werd het gas, alvorens het de kweekbakjes werd binnengeleid, door een met water van 34 graden Celsius gevulde wasfles geleid. (Bovendien was de paraffine – olie voor het gebruik met een fysiologische zoutoplossing verzadigd.) De 5% CO<sub>2</sub> was noodzakelijk om de pH van het (bicarbonaat gebufferde) medium constant op 7,2 te houden. De gehele opstelling stond in een klimaatkamer met een constante temperatuur van 34 graden Celsius zodat grote temperatuurschommelingen uitgesloten waren.

#### **IV – 2.11 Bereiden van een zaadcel – suspensie**

Twee tot twaalf maanden oude (C57BL6J) X (CBA) F – 1 mannetjes werden door cervicale dislocatie gedood. Vervolgens werden beide cauda epididymides geïsoleerd, het vetweefsel zoveel mogelijk verwijderd en in kleine kweekbakjes (Falcon tissue culture dish, ref. 3001 F, 35 x 10) met 2 cc medium gebracht. Met een pincet en een injectienaald werden de cauda epididymides in het medium in gedeelten uit elkaar gescheurd zodat de zaadcellen gemakkelijker in het medium kon komen. Het kweekbakje werd vervolgens op een verwarmd plateau geplaatst en van een constante gasfase voorzien. Dit plateau stond op een schudtafel welke met een snelheid van 20 rpm draaide. Na 30 – 60 minuten werden de



epididymisresten uit het medium verwijderd zodat een homogene zaadcellsuspensie kon ontstaan welke in het vervolg kortweg als "zaadcellsuspensie" zal worden aangeduid.

#### **IV – 2.12 In vitro bevruchting**

Twintig tot veertig geïsoleerde eicellen werden in 0,2 cc door paraffine-olie omgeven medium gebracht. Vervolgens werd 0,2 cc zaadcellsuspensie welke in een injectiespuit was gezogen aan de druppel medium toegevoegd. Het kweekbakje werd op de roterende verwarmde plaat gezet en van gastoevoer voorzien.

Na 6–8 uur incubatie in de zaadcellsuspensie werden de eicellen na twee keer spoelen, teneinde zoveel mogelijk cumulus- en zaadcellen te verwijderen, overgebracht in een nieuwe druppel medium en verder gekweekt.

#### **IV – 2.13 "Kaalmaken" van eicellen**

Eicellen kunnen van hun cumuluscellen ontdaan worden door 3–5 minuten incubatie in een hyaluronidase-oplossing. Deze oplossing bestond uit 350–500 I.E./ml. hyaluronidase (ovine testes, BDH.) opgelost in F–10 medium (Ham F–10 TC medium, Diko). Onmiddellijk nadat de eicellen kaal zijn worden ze drie keer gespoeld in medium en verder gekweekt. De incubatieduur in de hyaluronidase wordt mede bepaald door de post-ovulatoire leeftijd van de eicellen; oudere eicellen worden sneller "kaal" dan jongere.

#### **IV – 2.14 Chromosoompreparaten**

Chromosoompreparaten werden volgens een kleine modificatie van de door Tarkowski (Tarkowski, 1966) beschreven methode gemaakt. In het kort weergegeven ging dit als volgt:

- de objecten ("kale" eicellen, parthenogenonten of embryo's) werden in een hypotonische (1%) natriumcitraatoplossing gewassen en bij kamertemperatuur gedurende 5–15 minuten in een druppel van deze zelfde oplossing geïncubeerd op een vetvrij horlogeglas. (Tijdsduur is niet zo kritisch, wel wat langere tijd voor blastocysten.)
- de objecten opzuigen en met zo weinig mogelijk natriumcitraat oplossing op een vetvrij dekglasje brengen; een object per druppeltje, 4–6 objecten per dekglas.

- van geringe hoogte 1 – 2 druppeltjes 3:1 azijnzuur – ethanol op de druppel met het object laten "vallen".
- aan de onderzijde van het dekglaasje de plaats van het object aangeven om later langdurig zoeken te voorkomen.
- het geheel aan de lucht laten drogen.

Vervolgens werden de chromosomen gekleurd:

- 45 minuten in een orceïne oplossing: 10 g. orceïne (Merck, art. 7091) in 50 ml. ijsazijn en 50 ml. 65% melkzuur; deze oplossing 3 – 4 dagen laten staan en daarna filtreren. De kleuroplossing is 2 – 3 maanden houdbaar.
- 2 x 5 – 10 minuten in 45% azijnzuur.
- 5 minuten aqua dest.
- ontwateren via de alcohol – reeks: 30% – 40% – 50% – 60% – 70% – 80%
- 90% – alc. abs 2 x, 1:1 alc. abs: xylol, 2x xylol.
- insluiten (Malinol, Chroma, Stuttgart – Untertürkheim)
- 24 uur drogen bij 37 gr. C.

Aanvankelijk werden meerdere objecten per druppel aangebracht, doch bij latere chromosoomtellingen bleek hierdoor een onzekere factor geïntroduceerd te worden. Wanneer de objecten, en dus de chromosomen, namelijk vlak bij elkaar op het objectglas blijven liggen kan men de mogelijkheid niet uitsluiten dat er verkeerde conclusies worden getrokken indien er incidenteel tijdens de kleuring en ontwatering een object wordt "afgespoeld". Het is dan bijvoorbeeld niet mogelijk om met zekerheid te stellen of men twee haploïde sets chromosomen heeft van twee opgebrachte eencelligen of een diploïde set en een afgespoeld object.

#### IV – 2.15 Statistiek

Verschillen in resultaat tussen twee experimentele groepen werd bepaald volgens de t – test van Student. Verschillen werden als significant beschouwd wanneer de tweezijdige overschrijdingskans kleiner dan 0,05 was.

De behaalde resultaten worden meestal als gemiddelde met standaarddeviatie gegeven, terwijl sommige percentages gesplitst worden in twee waarden: het absolute en het relatieve percentage (A.P. en R.P.). Onder het absolute percentage wordt verstaan dat gedeelte wat een verkregen resultaat vormt ten opzichte van het totale aantal gebruikte eicellen in het betreffende experiment. Het relatieve percentage is dat gedeelte wat een verkregen resultaat vormt ten opzichte van een speciale groep bijvoorbeeld de geactiveerde eicellen uit het totale aantal gebruikte eicellen in dat betreffende experiment.

## HOOFDSTUK V

### PARTHENOGENESE NA INCUBATIE IN EEN HYALURONIDASE – OPLOSSING

#### V – 1 Inleiding

De eerste experimenten waarbij parthenogenese werd geïnduceerd door middel van hyaluronidase zijn uitgevoerd door Graham (1969, 1970, 1971 en 1972). Graham activeerde muize – eicellen door de cumuluscellen rond de eicellen te verwijderen door hyaluronidase – kristallen over deze cellen te strooien totdat een concentratie van ongeveer 100 I.E./ml. werd bereikt. Kaufman (1973) incubeerde eicellen gedurende 10 minuten in een medium met 100 I.E./ml hyaluronidase. De eicellen werden 14, 16, 18, 20 en 25 uur na de HCG – injectie geëxplanteerd, zodat het effect van de post – ovulatie leeftijd op het aktivatiepercentage bestudeerd kon worden. Duidelijk werd aangetoond dat deze leeftijd in sterke mate bepalend is voor het type parthenogenese – ontwikkeling dat geïnduceerd wordt en het aktivatiepercentage. Eicellen die 14 – 20 uur na HCG werden geëxplanteerd gaven aktivatiepercentages van 0 – 84%; van deze geactiveerde eicellen was 98% haploïde parthenogenont van het type 2pb1pn.

Eicellen welke 25 uur na HCG werden geëxplanteerd vertoonden een aktivatiepercentage van 75%, doch hiervan was 62% van het haploïde type i.c.

Kaufman (1973) concludeert dan ook: "The critical factor is clearly the age of the oocyte when the stimulus is applied".

Inmiddels had Graham (1971 en 1972) reeds aangetoond dat de osmotische waarde van het medium eveneens een belangrijke factor is welke het parthenogenonttype bepaalt. Dit onderzoek, en andere daarmee samenhangende experimenten, wordt later uitgebreid besproken in hoofdstuk VI.

Tarkovski (1971) constateerde dat de aktivatiefrequentie van de met hyaluronidase behandelde eicellen na incubatie in vitro veel hoger was dan na verdere groei in vivo. Dit verschil kan veroorzaakt worden door een remmende faktor in het oviduct of door een aktiverende faktor in het medium. Om deze vraag nader te bestuderen werden hyaluronidase – aktivatie – experimenten gedaan in combinatie met experimenten waarin uitsluitend het effect van explantatie en verdere in vitro kweek werd bestudeerd. De eicellen werden met de omringende cumuluscellen in HP geïncubeerd. Tevens werd de invloed van de postovulatie – leeftijd van de eicellen op de aktivatiefrequenties en parthenogenonttype – bepaling nagegaan. In wezen is dit dus de uitvoering van een blanco – experiment. Het is daarom des te opvallender dat deze experimenten nog niet eerder in de literatuur beschreven zijn. Wel vermeldt Kaufman (1973 – A) in de tekst dat "slechts in de oudere leeftijds groepen van de controle – eicellen, die in hyaluronidase – vrij medium

werden gekweekt, het manipuleren van de eicellen voldoende was om een gedeelte van de eicellen te activeren". Verdere gegevens inzake leeftijdsgroepen en/of aktivatiepercentages van deze controle – series worden echter niet gegeven. Deze waarnemingen zijn ook niet opgenomen in de tabel met het totaaloverzicht van alle experimenten. In een later onderzoek samen met Surani (Kaufman & Surani, 1974) worden echter wel enige aantallen en percentages vermeld. Bij 4 en 6 – 7,5 uur oude eicellen (respectievelijk 16 en 18 – 19,5 uur na de HCG – injectie) wordt ten gevolge van manipulatie respectievelijk 26,2% en 47,2% aktivatie gevonden; slechts 8 van de 141 geaktiveerde eicellen waren niet van het type 2pb1pn.

## V – 2 Materialen en methoden

### V – 2.1 Hyaluronidase – aktivatie

Teneinde de invloed van de postovulatie – leeftijd op het aktivatiepercentage en op de percentages verkregen parthenogenontypen te kunnen bepalen, werden spontaan geovuleerde eicellen respectievelijk 4h00', 6h00', 7h15' en 9h15' na ovulatie geëxplanteerd en met een korte incubatie in F – 10 medium (TC medium HAM F – 10, Difco) en met 350 – 500 I.E./ml hyaluronidase geaktiveerd. De incubatietijd varieerde van 3 tot 5 minuten, afhankelijk van het moment waarop alle cumuluscellen vrij waren van de eicel. Hoewel er dus een geringe variatie in de aktivatietijd was, is het effect van het aktivatiemedium op de eicel waarschijnlijk afhankelijk van de hoeveelheid cumuluscellen die de eicel nog omringen. Hiervan uitgaande is het beter de eicellen welke door meer cumuluscellen worden omgeven iets langer te incuberen dan eicellen met een geringer aantal cumuluscellen. Door de lengte van de incubatietijd te koppelen aan het moment waarop de eicel los van alle cumuluscellen is gekomen heeft men een beter vergelijkbare aktivatieprikkel dan wanneer men onafhankelijk van de cumulus steeds een zelfde incubatietijd hanteert. Na de incubatie werden de eicellen drie keer in HP gespoeld zodat de hyaluronidase zo veel mogelijk van de eicellen was afgespoeld. Daarna werd verder in HP geïncubeerd. De aktivatie en parthenogenont – type bepaling werd 6 – 8 uur na de hyaluronidasebehandeling gescoord.

Een gedeelte van de verkregen haploïde parthenogenonten werd in HP doorgekweekt teneinde de verdere in vitro ontwikkeling te kunnen vervolgen. De volgende ontwikkelingsstadia werden gescoord: tweecellig – , viercellig – , morula – en blastocyst – stadium. Op deze wijze werden drie leeftijdsgroepen vervolgd: 5h00', 7h15' en 9h15'.

## V – 2.2    Aktivatie ten gevolge van explantatie en voorincubatie in normaal medium

Groepen eicellen met verschillende postovulatie – leeftijden werden onmiddellijk na explantatie resp. gedurende korte en langere tijd in HP geïncubeerd. Dikwijls hadden de cumuluscellen na een langere incubatie reeds spontaan het contact met de eicel verloren. Soms moesten de eicellen echter alsnog door een zeer korte hyaluronidase – behandeling van de omringende cumuluscellen ontdaan worden teneinde het type parthenogenont te kunnen vaststellen. Deze waarnemingen werden zo snel mogelijk na de eventuele hyaluronidase – behandeling gedaan. Bij langere pre – incubatieperioden was de typebepaling niet mogelijk doordat de omringende cumuluscellen dit op het moment waarop deze typebepaling plaats dient te vinden verhinderen. Later waren de pronuclei in deze experimenten na de late hyaluronidase – behandeling reeds verdwenen. Ook een mogelijk aanwezig geweest tweede poollichaampje kon dan reeds gedegeneerd zijn. Bij een gedeelte van de geactiveerde eicellen werd de verdere in vitro ontwikkeling vervolgd. Gescoord werden slechts de aantallen bereikte tweecellige – , viercellige – , morula – en blastocyststadia.

## V – 3    Resultaten en discussie

### V – 3.1    De invloed van de ouderdom van de eicel

In tabel V – 1 staan de aktivatiepercentages vermeld van eicellen van verschillende leeftijdsgroepen als gevolg van een korte hyaluronidase – behandeling Tevens zijn de verschillende typen parthenogenonten welke werden verkregen vermeld.

Omdat de jongste leeftijdsgroep eicellen (explantatie 4 uur na ovulatie) na twee experimenten slechts in een geactiveerde eicel resulteerde werd volstaan met een geringer aantal eicellen (26) ten opzichte van de andere leeftijdsgroepen waarin met gemiddeld 120 eicellen werd gewerkt. Het hoogste aktivatiepercentage (47%) werd bij de zes uur oude eicellen gevonden. In de jongere leeftijdsgroepen werden nagenoeg uitsluitend haploïde 2pb1pn parthenogenonten verkregen, in totaal werden slechts 1 diploïde en 3 i.c. parthenogenonten gevonden tussen 153 geactiveerde eicellen, met andere woorden nog geen 3%. Ook Kaufman (1973) vond slechts circa 2% niet – haploïde (2pb1pn) parthenogenonten tussen de door hyaluronidase geactiveerde groepen eicellen welke 14 – 20 uur na de HCG injectie, dus 2 – 8 uur na super – ovulatie, waren geëxplanteerd.

Een hoger percentage i.c. parthenogenonten werd in de oudste leeftijdsgroep gevonden: 6%. Deze tendens, meer i.c. parthenogenonten bij oudere eicellen, werd ook reeds door Graham (1970) en Kaufman (1973) waargenomen. Laatstgenoemde vond tussen de geactiveerde eicellen van de oudste leeftijdsgroep, 13 uur na super – ovulatie (25 uur na HCG), 62% i.c. parthenogenonten. Hoewel Kaufman hogere aktivatiepercentages verkreeg dan de in dit onderzoek vermelde percentages,

Tabel V-1. Aktivatie en differentiatie van eicellen na een korte hyaluronidase - behandeling en geëxplanteerd op verschillende tijdstippen na spontane ovulatie.

Groep	Aantal experimenten	Post-ovulatie leeftijd	Aantal geïsoleerde eicellen	Aantal geactiveerde eicellen	Type aktivatie		i.c.
					2pb1pn	1pn of 2pn	
1	2	4h00'	26	1 (4%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
2	4	5h00'	85	34 (40%)	33 (97%)	1 (3%)	0 (0%)
3	8	6h00'	159	74 (47%)	72 (97%)	0 (0%)	2 (3%)
4	4	7h15'	115	44 (38%)	43 (98%)	0 (0%)	1 (2%)
5	6	9h15'	122	46 (38%)	40 (87%)	0 (0%)	6 (6%)

Tabel V-2. Verdere in vitro ontwikkeling van parthenogenonten geactiveerd door een korte hyaluronidase - behandeling.

Groep	Aantal experimenten	Post-ovulatie leeftijd	Aantal geïsoleerde eicellen	Aantal geactiveerde eicellen	Bereikte ontwikkelingsstadia			
					2 - cellig	4 - cellig	morula	blastula
2	4	5h00'	85	34 (40%)	19 (56%)	11 (32%)	3 (9%)	3 (9%)
4	3	7h15'	85	35 (41%)	27 (77%)	9 (26%)	2 (6%)	0 (0%)
5	1	9h15'	34	18 (53%)	6 (33%)	2 (11%)	1 (6%)	0 (0%)
Totaal		5h00' - 9h15'	204	87 (43%)	52 (60%)	22 (25%)	6 (7%)	3 (3%)

zijn de waargenomen tendensen (verloop van de aktivatiepercentages en de verkregen typen parthenogenonten) met elkaar in overeenstemming. De hogere aktivatiepercentages zijn waarschijnlijk een gevolg van de langere hyaluronidase – behandeling welke Kaufman toepaste: 10 minuten versus 3 – 5 minuten.

In een onderzoek samen met Surani werd deze incubatieperiode zelfs op 15 minuten gesteld. Er werden vier leeftijdsgroepen onderzocht: 2, 4 – 8, 9 en 13 – 13,75 uur na super – ovulatie. Een maximale aktivatie werd gevonden in de eicellen van de oudste groep: 75,4%, waarvan 33% type 2pb1pn en 62% type i.c. Ondanks de langere hyaluronidase – behandeling werd dus exact hetzelfde percentage i.c. parthenogenonten gevonden in deze leeftijdsgroep als in het eerdere onderzoek (Kaufman, 1973).

In de op een na oudste groep was het aktivatiepercentage weliswaar nagenoeg gelijk, 71,7%, maar in deze groep geaktiveerde eicellen kwamen bijna uitsluitend type 2pb1pn parthenogenonten voor: 92,6%. We zien hier dus eveneens een zeer sterke invloed van de leeftijd van de eicellen op het parthenogenont – differentiatiepatroon.

### **V – 3.2 Verdere in vitro ontwikkelingen van geaktiveerde eicellen**

In tabel V – 2 is de verdere in vitro ontwikkeling weergegeven van een gedeelte van de in tabel V – 1 vermelde parthenogenonten.

In de resultaten ten aanzien van de verdere ontwikkeling in vitro valt op dat parthenogenonten uit oudere leeftijdsgroepen eicellen afkomstig een wat lagere klievingsfrequentie en geringe doorgroei vertonen.

Kaufman & Sachs (1976) rapporteren aanzienlijke verschillen tussen de doorgroei van de verschillende typen parthenogenonten: 21% van type 2pb1pn, 66% van type 2pn en 65% van type i.c. ontwikkelde zich binnen 98 – 100 uur voorbij het viercellig stadium. Een aanmerkelijk geringere doorgroei voor de type 2pb1pn parthenogenonten, dit percentage komt overeen met het in dit onderzoek verkregen voor de drie leeftijdsgroepen gemiddelde percentage van 25%. Wel vond Kaufman & Sachs een aanzienlijk hoger percentage blastocysten na verdere in vitro kweek van type 2pb1pn parthenogenonten gedurende 120 uur: 21%.

Iles et al. (1975) onderzochten de verdere ontwikkeling van geaktiveerde eicellen in vivo, onder andere na transplantatie in het oviduct van pseudozwangere recipiënten. Drie dagen na transplantatie werd 75% van de getransplanteerde

Tabel V-3 Aktivatie en differentiatie ten gevolge van explantatie en incubatie in normaal medium (zonder hyaluronidase) afhankelijk van het explantatie-tijdstip en de tijdsduur van de incubatie.

\*(Bij de eicellen uit de langste incubatieperiode waren waarnemingen ten aanzien van het type parthenogonoot door de omringende cumuluscellen niet mogelijk.)

Groep	Aantal experimenten	Post-ovulatie leef-tijd tijdens explantatie	In vitro incubatie periode (in uren)	Aantal geïsoleerde eicellen	Aantal geakti-veerde eicellen	Typen parthenogonooten		
						2pb1pn	2pn of 1pn	i.c.
1	3	5h15'	2,5 - 3,25	58	24 (41%)	22 (92%)	0 (0%)	2 (8%)
2	6	6h15' - 8h30'	4 - 4,5	97	38 (39%)	33 (87%)	3 (8%)	2 (5%)
3	4	5h45' - 10h55'	22,5 - 26,75	86	34 (40%)	*	*	*

Tabel V-4. Verdere in vitro ontwikkeling van parthenogonooten geactiveerd door explantatie en incubatie in normaal medium.

Groep	Aantal experimenten	Post-ovulatie leef-tijd tijdens explantatie	In vitro incubatie periode (in uren)	Aantal geïsoleerde eicellen	Aantal geakti-veerde eicellen	Bereikte ontwikkelingsstadia			
						2-cellig	4-cellig	morula	blasto-cyst
1	2	5h00'	2,5 - 3,25	39	15 (38%)	6 (40%)	3 (20%)	1 (7%)	
2	3	6h15' - 6h50'	4 - 4,5	56	15 (27%)	8 (53%)	4 (27%)	0 (0%)	
3	4	5h45' - 10h55'	22,5 - 26,75	86	34 (40%)	7 (21%)	4 (12%)	1 (3%)	
Totaal		5h00' - 10h55'	2,5 - 26,75	181	64 (35%)	60(94%)	21(33%)	11(17%)	2(3%)



icellen teruggevonden; hiervan had 44% het morulastadium bereikt en 22% het blastulastadium. Het percentage verkregen blastocysten verschilt dus niet na incubatie van geactiveerde eicellen in vitro of in vivo.

Graham (1970) verkreeg onder optimale omstandigheden slechts 9% blastocysten uit getransplanteerde geactiveerde eicellen. Gezien de grote verschillen in activatie en ontwikkeling van eicellen van verschillende stammen (Graham & Deussen, 1974) hebben bovenstaande cijfers uitsluitend betrekking op C57BL/C3H eicellen.

### **V-3.3 De invloed van de voor de activatie noodzakelijke manipulaties van de eicellen.**

In tabel V-3 zijn de activatie- en parthenogenonttype percentages gegeven van eicellen welke na explantatie in normaal medium werden geïncubeerd. De tijdsduur van deze incubatie en het explantatie-tijdstip ten opzichte van de ovulatie werd gevarieerd.

Het effect van de postovulatie-leeftijd op de activatiepercentages blijkt minimaal te zijn: activatiepercentages (41, 39 en 40%). Ook de verkregen typen parthenogenonten verschillen slechts weinig. De activatiepercentages liggen veel lager dan de activatiepercentages van even oude eicellen na hyaluronidasebehandeling. Zij komen overeen met de door Kaufman & Surani (1974) gevonden waarden. Deze vonden bij 4 en 6-7,5 uur oude eicellen respectievelijk 26,2% en 47,2% activatie. Hiervan was 94% van het parthenogenont-type 2pb1pn. In dit onderzoek bedraagt dit percentage 89%. Bij het gevonden activatiepercentage van groep 3 moeten we ons goed realiseren dat de activatie van eicellen bepaald werd door het al dan niet bereiken van het tweecellig stadium. Het is echter waarschijnlijk dat hierdoor een vertekend beeld ontstaat doordat uit de groepen 1 en 2 blijkt dat 7-20% van de geactiveerde eicellen het tweecellig stadium niet bereikt. Het werkelijke activatiepercentage van groep 3 ligt dan ook waarschijnlijk hoger.

### **V-3.4 Verdere in vitro ontwikkelingen van uitsluitend door het manipuleren geactiveerde eicellen**

In tabel V-4 is de verdere in vitro ontwikkeling vermeld van een gedeelte van de in tabel V-3 vermelde geactiveerde eicellen.

Bij de interpretatie van de in tabel V-4 vermelde percentages moeten enige kritische kanttekeningen geplaatst worden.

Ten eerste is er mogelijk een invloed van de zeer korte hyaluronidase – behandeling bij de eicellen uit groep 1 en 2. Het is niet na te gaan in hoeverre dit van invloed is op de verdere in vitro ontwikkeling van deze eicellen.

Ten tweede zijn de percentages van de verdere in vitro ontwikkeling van de eicellen uit groep 3 waarschijnlijk aan de hoge kant omdat uitgegaan is van tweecellige parthenogenonten. Hierdoor is een gedeelte buiten beschouwing gebleven om eerder vermelde redenen.

Indien men de ontwikkelingspercentages toch wil vergelijken met die uit tabel V-2 dan moeten van beide groepen de absolute percentages, dus ten opzichte van de aantallen geïsoleerde eicellen, worden berekend. Het is opvallend dat de gemiddelden van de bereikte ontwikkelingsstadia dan in beide experimenten nagenoeg gelijk liggen. Deze gemiddelden zijn voor de vier bekeken ontwikkelingsstadia in de door hyaluronidase en door explantatie geactiveerde groepen respectievelijk 25% – 33%, 11% – 12%, 3% – 6% en 1% – 1%.

#### V-4 Conclusies

Op grond van de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat de hyaluronidase geen werkelijk bijdrage levert aan de parthenogenetische activatie gezien de met elkaar overeenkomende activatiepercentages van deze groepen en die van de controle – experimenten. Ook de verschillende typen parthenogenonten worden in nagenoeg gelijke percentages verkregen. Het is niet bekend in hoeverre er in vivo in de tuba ook spontane parthenogenese optreedt. Indien dat niet het geval is kan de parthenogenese zowel veroorzaakt worden door het wegvallen van de in de tuba aanwezige remmende factoren alsmede door een stimulerende invloed van de explantatie en verdere in vitro kweek. Toevoeging van een korte hyaluronidasebehandeling heeft dus geen extra stimulerende invloed. Wel geeft de hyaluronidasebehandeling twee andere voordelen: ten eerste kan men de eicellen beter waarnemen en desgewenst het type parthenogeneont bepalen en ten tweede zijn de eicellen zonder cumuluscellen gemakkelijker te manipuleren.



**HOOFDSTUK VI.**

**PARTHENOGENESE NA INCUBATIE IN EEN MEDIUM MET EEN  
NIET – FYSIOLOGISCHE OSMOTISCHE WAARDE**

**VI – 1 Inleiding**

De techniek om parthenogenese op experimentele wijze te induceren door incubatie van eicellen in een medium met een niet – fysiologische osmotische waarde werd reeds in 1905 door Loeb toegepast bij zeeëgel – eieren. Hoewel deze aktivatiemethode dus al lang bekend was werd zij pas in 1936 voor het eerst toegepast bij eicellen van zoogdieren.

In dat jaar publiceren Pincus & Enzmann (1936) de resultaten van een serie aktivatie – experimenten bij konijne – eicellen. Zij gebruikten diverse aktivatiemethoden waaronder de incubatie van recent geovuleerde eicellen in hypertone media. Hoewel gesteld werd dat uitsluitend een incubatie van 5 – 10 minuten in een hypertone oplossing effectief zou zijn, werden er geen nadere bijzonderheden bekend gemaakt over aktivatiepercentages. Slechts de, enigszins vertraagde, vorming van 1 – 3 (?) poollichaampjes werd gemeld. Men kan zich echter afvragen of hier inderdaad sprake was van vorming van poollichaampjes omdat er geen nader onderzoek, bijvoorbeeld naar de aanwezigheid van chromatine in deze poollichaampjes, werd gemeld. Mogelijk waren het slechts cytoplasmatische uitstulpingen en afsnoeringen. Vier jaar later publiceert Pincus samen met Shapiro (Pincus & Shapiro, 1940) de resultaten van verder onderzoek naar aktivatie van eicellen. Bij deze serie aktivatie – experimenten werd onder andere het effect van incubatie in een hypotonische oplossing onderzocht. Er werd met verschillende verdunningen gewerkt (40, 50 en 60% oplossingen) terwijl de incubatieperioden varieerden van 3 – 60 minuten. In deze experimenten werd een gemiddeld aktivatiepercentage gevonden van 34%, waarbij in 13% van de eicellen een klievingsdeling optrad. Ook toen werden echter geen nadere bijzonderheden vermeld. Deze methode om parthenogenese te induceren raakt daarna weer enige tijd op de achtergrond, waarschijnlijk vooral door het feit dat zoveel betere resultaten werden verkregen met andere aktivatiemethoden, met name door een tijdelijke afkoeling van de eicellen.

Ook nu duurde het weer een lange tijd, ruim 30 jaar, alvorens deze aktivatiemethode wederom op zoogdiereicellen, meest muize – eicellen, toegepast zou worden.

Graham (1971, 1972) toonde aan dat een lagere osmolariteit van het medium in

toenemende mate de onderdrukking van de vorming van het tweede poollichaampje tot gevolg had.

Kaufman & Surani (1974) onderzochten het effect van de postovulatoire leeftijd van de eicellen en van de osmolariteit van het medium. In beide gevallen werden de eicellen eerst van hun cumuluscellen ontdaan door een korte hyaluronidase-behandeling. Bij toenemende ouderdom van de eicellen werd een hoger aktivatiepercentage verkregen. De osmolariteit van het medium bleek echter een grote invloed te hebben op het type parthenogenese dat geïnduceerd werd, met name na incubatie in hypotonisch medium.

In een ander onderzoek, Kaufman & Gardner (1974), werd dezelfde aktivatiemethode toegepast doch in deze experimenten werd de verdere ontwikkeling van de verkregen parthenogenonten in vivo bestudeerd na transplantatie in pseudo – zwangere recipiënten.

Graham & Deussen (1974) pasten deze aktivatiemethode ook toe in hun onderzoek naar mogelijke veranderingen in aktivatiepercentages als gevolg van genetische verschillen. Zij onderzochten daartoe eicellen van zes verschillende stammen en vonden grote verschillen in de aktivatiefrequenties van eicellen van raszuivere donoren.

Ook Iles et al. (1975) toonden met deze methode verschillen in aktivatiepercentages aan bij verschillende stammen.

Alle hierboven vermelde onderzoeken uit de zeventiger jaren hebben onder andere met elkaar gemeen dat er eerst een korte hyaluronidasebehandeling aan de eicellen werd gegeven. Het is echter bekend, zie hoofdstuk V van dit proefschrift, dat deze behandeling op zich al effectief is om parthenogenese te induceren, zodat er uit deze proeven geen conclusies zijn te trekken ten aanzien van uitsluitend het effect van de incubatie in een hypotonische oplossing. Alleen het reeds vermelde onderzoek van Pincus & Shapiro (1940) zou deze mogelijkheden hebben kunnen bieden. In dit geval zijn echter te weinig nadere gegevens bekend, is er aan te weinig eicellen onderzoek verricht, terwijl er bovendien onvoldoende systematisch onderzoek is verricht naar het effect van de incubatietijdsduur en het effect van de verschillende osmotische waarden van de gebruikte aktivatiemedia.

Het hierna volgende onderzoek is opgezet om met name het effect van deze laatste twee variabelen te onderzoeken. Het effect dus van afwijkende osmotische waarden en de tijdsduur van de incubatieperioden. Tevens werd als derde variabele de invloed van de post – ovulatoire leeftijd van de eicellen op de aktivatiepercentages nagegaan. Bovendien werd het effect van een aanzienlijk groter aantal verschillende osmotische waarden onderzocht terwijl er in algemene zin sprake is van een meer

gedetailleerde opzet van de experimenten ten opzichte van de tot heden verrichte studies.

## VI-2 Materiaal en methoden

### VI-2.1 De invloed van de osmolariteit van het aktivatiemedium

Groepen eicellen werden 4,5 – 5,5 uur na spontane ovulatie geëxplan – teerd en aansluitend gedurende 2 uur en 25 minuten in een aktivatiemedium geïncubeerd. Dit medium werd verkregen door het "normale kweekmedium", 1/1 HP, met tridest te verdunnen; 2/10 HP bijvoorbeeld bestond uit 8 volumedelen tridest en 2 volumedelen 1/1 HP.

Er werd een verdunningsreeks van 2/10 HP tot en met 9/10 HP toegepast. De osmotische waarden van deze media werden bepaald met behulp van een Osmette A (Precision Systems Inc.) en staan vermeld in tabel VI-I.

Van iedere verdunning werden minimaal drie metingen verricht.

Tabel VI-I. Overzicht van de osmotische waarden van de verschillende aktivatiemedia.

Medium	Osmotische waarde in miliosmol
2/10	54
3/10	81
4/10	108
5/10	135
6/10	162
7/10	189
8/10	216
9/10	243
10/10	270

Na incubatie in het aktivatiemedium werden de eicellen ontdaan van de nog resterende omringende cumuluscellen door een zo kort mogelijke hyaluronidase – behandeling en vervolgens drie keer in 1/1 HP gespoeld en verder in 1/1 HP geïncubeerd. De hyaluronidasebehandeling varieerde van een halve tot maximaal 5 minuten. Na 4-6 uur werden de verschillende typen geselecteerd, geregistreerd en bijeengebracht in geselecteerde groepen van 20-40 geactiveerde eicellen. Deze groepen met hetzelfde type parthenogenont werden gedurende 120 uur verder geïncubeerd in 1/1 HP teneinde de verdere ontwikkeling te kunnen vervolgen.

## VI-2.2 De invloed van de lengte van de incubatieperiode in het aktivatiemedium

Naast de invloed van de verschillende osmotische waarden van het aktivatiemedium op het aktivatiepercentage en de verdere in vitro ontwikkeling werd ook de invloed van de tijdsduur van deze incubatie onderzocht. Deze variatie in incubatietijd werd bij 4 verdunde oplossingen onderzocht: 3/10 HP, 6/10 HP, 8/10 HP en 9/10 HP. Een overzicht van deze verschillende incubatietijden bij bepaalde aktivatiemedia wordt in tabel VI-II gegeven. De eicellen voor deze experimenten werden 9 - 10 uur na superovulatie geëxplanteerd en na incubatie in het aktivatiemedium van de omringende cumuluscellen ontdaan door een zo kort mogelijke hyaluronidase-behandeling en vervolgens op dezelfde wijze, zoals expliciet vermeld in VI-2.1, verder behandeld en in hun verdere ontwikkeling vervolgd.

Tabel VI-II. Overzicht van experimenten met de gebruikte verschillende incubatietijden in media met 4 verschillende verdunningen.

concentratie HP	onderzochte incubatietijden					
3/10 HP :	15'	—	1h15'	2h25'	4h00'	—
4/10 HP :	15'	45'	1h15'	2h25'	4h00'	—
5/10 HP :	15'	—	1h15'	2h25'	4h00'	5h30'
6/10 HP :	15'	45'	1h15'	2h25'	4h00'	—

## VI-2.3 De invloed van de post-ovulatoire leeftijd van de eicellen bij een constante incubatieperiode en een gelijk aktivatiemedium.

In deze experimenten werden de eicellen gedurende 2h25' in 6/10 HP geactiveerd en verder behandeld zoals vermeld staat in VI-2.1. De eicellen waren deels afkomstig van spontaan ovulerende muizen, (explantatie 5, 6, 7, 8 en 9 uur na ovulatie) en deels van muizen met geïnduceerde superovulatie (explantatie 4, 6, 17, 19, 21, 24, 27 en 30 uur na ovulatie).

## VI-3 Resultaten en discussie

### VI-3.1 De invloed van de osmolariteit van het aktivatiemedium

#### VI-3.1.1 De invloed van de osmolariteit van het aktivatiemedium op de aktivatiefrequentie en de parthenogonotype - differentiatie

In tabel VI-III staan de resultaten vermeld van de in VI.2.1 beschreven experimenten. Slechts bij 2/10 HP en 10/10 HP vinden we sterk verminderde aktivatiepercentages (respectievelijk 3% en 8%), in de overige verdunningen treden

Tabel VI — III Aktivatie en differentiatie van eicellen na incubatie gedurende twee uur en 30 minuten in media met verschillende osmolariteiten. Explantatie vond plaats 4,5 — 5,5 uur na spontane ovulatie.

HP — concentratie	aantal geïncubeerde eicellen	type selectie en percentages ten opzichte van de aantallen geïncubeerde en geactiveerde eicellen											
		fr.pn.		1pn		2pn		2pb1pn		i.c.			
		n	A.P.	R.P.	n	A.P.	R.P.	n	A.P.	R.P.	n	A.P.	R.P.
2/10	113	3	3%	100%	0	—	—	0	—	—	0	—	—
3/10	133	88	66%	99%	0	—	—	0	—	—	0	1%	1%
4/10	117	51	43%	65%	16	14%	20%	11	9%	14%	1	1%	1%
5/10	135	15	11%	18%	49	36%	58%	18	13%	21%	0	—	—
6/10	121	0	—	—	24	20%	34%	17	14%	24%	15	12%	21%
7/10	110	0	—	—	7	6%	10%	20	18%	29%	34	31%	49%
8/10	187	0	—	—	2	1%	2%	18	10%	15%	100	54%	81%
9/10	109	0	—	—	0	—	—	5	5%	13%	32	29%	84%
10/10	116	0	—	—	0	—	—	0	—	—	9	8%	100%

fr.pn. = gefragmenteerde pronuclei.

A.P. = absolute percentages, dat wil zeggen ten opzichte van het aantal geïncubeerde eicellen.

R.P. = relatieve percentages, dat wil zeggen ten opzichte van het aantal geactiveerde eicellen.



slechts minimale kwantitatieve verschillen op. De kwalitatieve verschillen zijn echter des te opvallender: een constant toenemend percentage haploïde parthenogenonten bij minder verdunde media.

De tabellen VI – III en VI – IV geven de aktivatie en differentiatie van eicellen na incubatie gedurende 2,5 uur in media met verschillende osmolariteiten. Explantatie vond plaats 4,5 – 5,5 uur na spontane ovulatie.

Brinster (1965) toonde aan dat bevruchte eicellen in vitro een grote tolerantie ten aanzien van de osmotische waarde van het milieu bezitten. De embryo's doorstonden deze afwijkende osmolariteiten gedurende een beperkte tijdsduur zonder nadelige gevolgen.

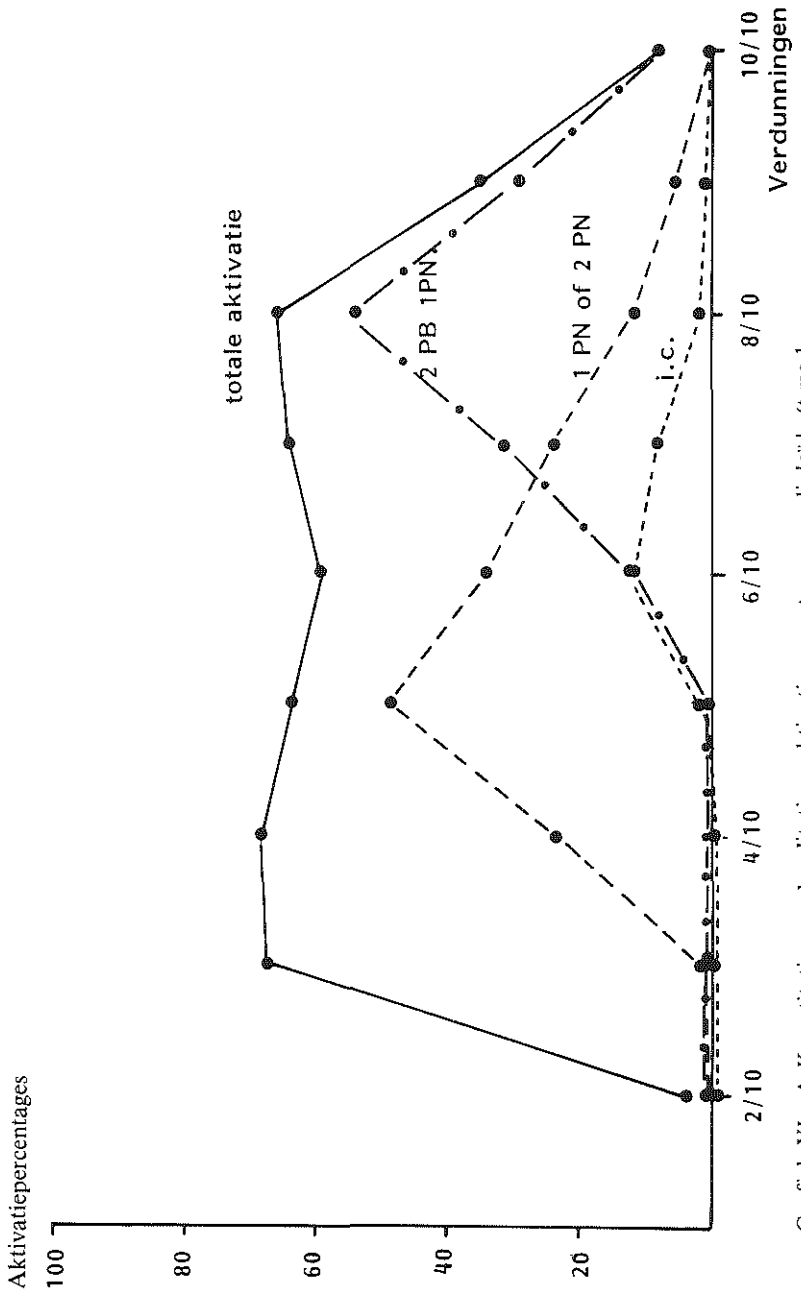
Opas (1977) nam waar dat een bepaald percentage van bevruchte eicellen gedurende een zeer korte tijd (3 – 6 minuten) extreem lage osmotische waarden konden weerstaan.

Uit het verloop van de aktivatiepercentages in grafiek VI – A komen de grote verschillen nogmaals duidelijk naar voren. Na incubatie in sterk verdunde media (2/10 en 3/10) ontstaan nagenoeg uitsluitend parthenogenonten met gefragmenteerde pronuclei. Kennelijk hebben deze lage osmotische waarden zo'n sterke invloed op de eicellen dat zelfs de pronuclei uitéénvallen. Bij incubatie in 5/10 HP verkrijgt men een maximale opbrengst van diploïde parthenogenonten (50%); 6/10 HP geeft een (laag) maximum (12%) aan i.c. parthenogenonten, terwijl men bij 8/10 HP een opbrengst van 54% haploïde parthenogenonten type 2pb 1pn krijgt.

Het blijkt dus dat de osmotische waarde van het aktivatiemedium een sterke invloed heeft op de verdeling van de verschillende typen parthenogenonten welke men verkrijgt. Dit gegeven kan men eventueel gebruiken indien men een maximale opbrengst van een bepaald type parthenogenont wenst. Wil men bijvoorbeeld onderzoek verrichten aan haploïde parthenogenonten dan zal men 8/10 HP als incubatiemedium moeten gebruiken. Graham & Deussen (1974) toonden aan dat voortgezette kweek van met hyaluronidase (100 I.E./ml; 10 – 15 minuten) geactiveerde eicellen (explantatie 17 – 19 uur na HCG) gedurende 2 uur in 3/5 en 4/5 medium een verhoogd percentage potentieel diploïde parthenogenonten met een of twee pronuclei tot gevolg had (tabel VI – V).

Tabel VI – V. Resultaten van Graham & Deussen (1974), zie tekst voor deze tabel.

Fl	medium	n	2pb1pn	i.c.	2pn	1pn
C57BLXCBA	5/5	117	73,5%	9,4%	14,6%	2,5%
C57BLXCBA	4/5	105	58,1%	16,2%	24,8%	0,9%
C57BLXCBA	3/5	154	37,0%	18,8%	23,4%	20,8%



Grafiek VI - A Kwantitatieve en kwalitatieve aktivatiepercentages van diploide (type 1 pn of 2pn) —, haploide (type 2pb 1pn) — en haploide (type i.c.) parthenogonoten na incubatie in verschillend verdunde media.

Iles et al. (1975) activeerden eicellen 10 – 15 min. in een hyaluronidase – oplossing (200 I.E./ml.) en kweekten de eicellen gedurende twee uur verder in 5/5 en 3/5 medium en vervolgens in 5/5 medium. De volgende resultaten werden verkregen (Tabel VI – VI).

Tabel VI – IV. Deze subtabel geeft een overzicht van de aantallen gedegeneerde en geactiveerde eicellen die zich na incubatie tussen de oorspronkelijke aantallen geïncubeerde eicellen bevonden. Tevens zijn de totale aktivatiepercentages gegeven. Het betreft hier dus dezelfde eicellen als die, die in tabel VI – III staan vermeld.

HP- -concen- -tratie	aantal geïncubeerde eicellen	aantal gedegeneerde eicellen	aantal geactiveerde eicellen	aktivatie – percentage
2/10	113	108	3	3%
3/10	133	25	89	67%
4/10	117	15	79	68%
5/10	135	18	85	63%
6/10	121	4	71	59%
7/10	110	0	70	64%
8/10	187	0	124	66%
9/10	109	0	38	35%
10/10	116	0	9	8%

Tabel VI – VI. Resultaten van Iles et al. (1975), zie tekst voor deze tabel.

F1	medium	aktiv. perc.	2pb 1pn	i.c.	2 pn	1 pn	2pn of 1pn
C57BLXA2G	5/5	42,0%	65,1%	8,7%	26,2%	0 %	26,2%
C57BLXA2G	3/5	63,6%	8,1%	28,3%	35,0%	28,6%	63,6%
C57BLXC3H	3/5	46,0%	40,7%	25,5%	12,0%	21,8%	33,8%

De lagere aktivatiefrequenties worden mogelijk veroorzaakt door het feit dat Iles et al. met muizen uit andere kruisingen werkten. Graham & Deussen hadden reeds aangetoond dat hierdoor grote verschillen in aktivatiefrequenties werden veroorzaakt.

Kaufman & Surani (1974) vonden na 10' - 15' hyaluronidasebehandeling (100 I.E./ml) eveneens een onderdrukking van de vorming van het tweede poollichaampje bij 2,25 uur verdere kweek in hypotoon medium (ouderdom eicellen: 8 - 9 uur na superovulatie), (Tabel VI - VII).

Tabel VI - VII. Resultaten van Kaufman & Surani (1974), zie tekst voor deze tabel.

F1	medium	aktiv. perc.	n	2pb1pn	i.c.	2 pn	1 pn
C57BLXA2G	5/5	74,0%	737	93,6%	3,9%	0 %	2,6%
C57BLXA2G	4/5	73,8%	107	86,1%	1,3%	0 %	12,7%
C57BLXA2G	3/5	75,2%	1633	29,8%	12,5%	1,5%	56,2%

Opvallend is het gelijke aktivatiepercentage wat bij drie verschillende osmotische waarden wordt verkregen (73,8 - 75,0%). Bovendien liggen deze waarden aanzienlijk hoger dan die welke door Iles et al. (1975) gevonden werden (42,0 - 63,0%); Graham & Deussen vermelden deze aktivatiepercentages niet!

In afwijking met de door Kaufman & Surani gevonden gelijke aktivatiepercentages, respectievelijk 75,2 - 73,8 en 74,0, werden in dit onderzoek lagere en teruglopende percentages gevonden, namelijk respectievelijk 59 - 66 (-35) en 8%.

De verschillen in aktivatiepercentages worden groter naarmate het aktivatiemedium afwijkt van de fysiologische osmotische waarde (8/10, 9/10 en 10/10 HP). Bij deze geringe verdunningen is de osmotische aktivatie kennelijk te gering ten opzichte van de hyaluronidase - aktivatie zoals door Kaufman & Surani werd gebruikt.

Uit deze resultaten zou men kunnen concluderen dat het aktive - ercentage bepaald wordt door de hyaluronidasebehandeling maar dat het type parthenogenont vervolgens bepaald wordt door de osmotische waarde van het incubatiemedium waarin de geactiveerde eicellen zich verder ontwikkelen. Blijft de hyaluronidase - incubatie achterwege, zoals in het eigen onderzoek, dan treedt in

Tabel VI - VIII Overzicht van de verdere in vitro ontwikkeling van verschillende typen parthenogenonten geactiveerd door incubatie gedurende 2 uur en 30 minuten in verschillend verdunde media, dus in media met verschillende osmotische waarden.

HP - con - fra - tie	aantal geëx - plan - teerde	type en aantal verkegen partheno -	verdere in vitro ontwikkeling															
			tweecellig				viereellig				morula				blaastocyst			
			n	A.P.	R.P.	%	n	A.P.	R.P.	%	n	A.P.	R.P.	%	n	A.P.	R.P.	%
2/10	113	fr.pn.,	3	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
		1pn,2pn:	0	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
		2pb1pn: i.c.:	0	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
3/10	77	fr.pn.,	61	59	73%	92%	20	26%	33%	13	17%	21%	3	4%	5%	---	---	---
		1pn,2pn:	1	1	1%	100%	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
		2pb1pn: i.c.:	0	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
4/10	102	fr.pn.,	78	62	61%	79%	19	19%	24%	5	5%	6%	0	---	---	---	---	
		1pn,2pn:	1	1	1%	100%	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
		2pb1pn: i.c.:	0	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
5/10	75	fr.pn.,	53	33	44%	62%	23	31%	43%	16	21%	30%	5	7%	9%	---	---	
		1pn,2pn:	0	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
		2pb1pn: i.c.:	1	1	1%	100%	1	1%	100%	0	---	---	0	---	---	0	---	---
6/10	56	fr.pn.,	25	20	36%	80%	5	27%	60%	5	9%	20%	0	---	---	---	---	
		1pn,2pn:	5	2	4%	40%	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
		2pb1pn: i.c.:	10	10	18%	100%	5	9%	50%	0	---	---	0	---	---	0	---	---
7/10	95	fr.pn.,	18	18	19%	100%	10	11%	56%	8	8%	44%	2	2%	11%	---	---	
		1pn,2pn:	30	27	28%	90%	9	10%	30%	2	2%	7%	0	---	---	---	---	
		2pb1pn: i.c.:	7	7	7%	100%	7	7%	100%	5	5%	71%	1	1%	14%	---	---	
8/10	108	fr.pn.,	13	13	12%	100%	11	10%	85%	10	9%	77%	8	7%	62%	---	---	
		1pn,2pn:	48	44	41%	92%	9	8%	19%	4	4%	8%	1	1%	2%	---	---	
		2pb1pn: i.c.:	1	1	1%	100%	1	1%	100%	0	---	---	0	---	---	0	---	---
9/10	77	fr.pn.,	3	3	4%	100%	2	3%	67%	2	3%	67%	2	3%	67%	---	---	
		1pn,2pn:	24	16	21%	67%	6	8%	25%	2	3%	8%	0	---	---	---	---	
		2pb1pn: i.c.:	1	1	1%	100%	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
10/10	96	fr.pn.,	0	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---
		1pn,2pn:	5	4	4%	80%	2	2%	40%	0	---	---	0	---	---	0	---	---
		2pb1pn: i.c.:	0	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---	0	---	---

TABEL VI – IX Vergelijking van de verdere in vitro ontwikkeling van de verschillende typen parthenogenonten na incubatie in verschillend verdunde media.

parth. type:	diploid, type 1pn of 2pn				haploid, type 2pb1pn				haploid, type i.c.						
	n	2c	4c	M	B	n	2c	4c	M	B	n	2c	4c	M	B
<b>HP.</b>															
bereikte stadium															
–concentratie															
2/10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3/10	61	59	20	13	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4/10	78	62	19	5	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5/10	53	33	23	16	5	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
6/10	25	20	5	5	0	5	2	0	0	0	10	10	5	0	0
7/10	18	18	10	8	2	30	27	9	2	0	7	7	7	5	1
8/10	13	13	11	10	8	48	44	9	4	1	1	1	1	0	0
9/10	3	3	2	2	2	24	16	6	2	0	1	1	0	0	0
10/10	0	0	0	0	0	5	4	2	0	0	0	0	0	0	0
<b>totaal</b>	<b>254</b>	<b>208</b>	<b>90</b>	<b>59</b>	<b>20</b>	<b>114</b>	<b>95</b>	<b>26</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>1</b>
<b>percen – tage</b>	<b>100%</b>	<b>82%</b>	<b>34%</b>	<b>23%</b>	<b>8%</b>	<b>100%</b>	<b>83%</b>	<b>23%</b>	<b>7%</b>	<b>1%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>70%</b>	<b>25%</b>	<b>5%</b>

de controlegroep (normaal 10/10 medium) slechts 8% aktivatie op (V – III) en wel uitsluitend type 2pb1pn.

Afwijkend zijn de resultaten welke verkregen werden als gevolg van uitsluitend "het manipuleren" van de eicellen, dus een in vitro incubatie in 10/10 medium zonder hyaluronidasebehandeling. Bij eicellen welke 4 en 6 – 7,5 uur na ovulatie geëxplanteerd werden trad resp. 26 en 47% aktivatie op (Kaufman & Surani, 1974). In het eigen onderzoek werd slechts 8% aktivatie gevonden. Het betrof hier eicellen welke 4,5 – 5,5 uur na spontane ovulatie waren geëxplanteerd.

### **VI – 3.1.2 De invloed van de osmolariteit van het aktivatiemedium op de verdere in vitro ontwikkeling**

Bij een gedeelte van de in tabel VI – III verkregen geaktiveerde eicellen werden de overeenkomstige typen parthenogenonten bijeengebracht en werd de verdere doorgroei in vitro bestudeerd. Deze proeven zijn van belang wanneer men bijvoorbeeld wil weten op welke wijze men zoveel mogelijk diploïde morulae kan verkrijgen voor eventuele fusie – experimenten met normale morulae. Immers een hoog aktivatiepercentage garandeert niet automatisch een hoog percentage morulae. Het is niet ondenkbaar dat bij een hoog aktivatiepercentage een relatief geringe verdere ontwikkeling optreedt. Tevens geeft de verdere in vitro doorgroei van de geaktiveerde eicellen een indruk over de vitaliteit. De resultaten van deze verdere in vitro ontwikkelingen staan vermeld in tabel VI – VIII.

Dezelfde getallen uit tabel VI – VIII zijn op een andere wijze gegroepeerd in tabel VI – IX waardoor een beter overzicht van de verdere in vitro ontwikkeling per type parthenogenont in de diverse media duidelijker zichtbaar wordt.

Kaufman & Gardner (1974) onderzochten de verdere ontwikkeling van in vitro geaktiveerde parthenogenonten in vivo na transplantatie op dag 1 in oviducten van pseudo – zwangere recipiënten. De aktivatie vond plaats met behulp van een hyaluronidasebehandeling (10' – 15', 100 I.E./ml) gevolgd door 2,25 uur incubatie in 3/5 medium. Na analyse op dag 6 of 7 werden bij haploïde (2pb1pn), onmiddellijk delende en diploïde parthenogenonten respectievelijk 53,1; 35,0 en 37,5% implantaties gevonden (controle met behulp van bevruchte eicellen: 77,1%). In een andere groep dieren werden de oviducten en uteri op dag 4 onderzocht op verder ontwikkelde, op dag 1 getransplanteerde diploïde parthenogenonten. Er werd een doorgroei van 63% gevonden tot het morula – of blastocyst – stadium. Deze cijfers liggen aanzienlijk hoger dan de in dit hoofdstuk vermelde resultaten. Na verdere in vitro kweek bereikte slechts 20% het morula – of blastocyst – stadium. Het is niet zeker of deze verschillen veroorzaakt worden

doordat een in vivo milieu altijd beter is dan een in vitro milieu of dat dit komt door de verschillende aktivatiemethoden.

### VI-3.2 De invloed van de lengte van de incubatieperiode

De invloeden van de lengte van verschillende incubatieperiodes in aktivatiemediën met vier verschillende osmotische waarden (zie tabel VI-II) op de totale aktivatiepercentages, de typen verkregen parthenogenonten en de verdere in vitro ontwikkelingen van deze onderscheidenlijke typen parthenogenonten zijn weergegeven in tabel VI-X.

De gemiddelde aktivatiepercentages voor de vier gebruikte verdunningen, 3/10, 6/10, 8/10 en 9/10, waren respectievelijk  $(44 + 14 + 21):144 = 55\%$ ,  $(54 + 15 + 4):98 = 74\%$ ,  $(42 + 1 + 2):56 = 80\%$  en  $(30 + 3 + 1):37 = 92\%$ .

Uit de vrij complexe tabel VI-X zijn de grafiek VI-B en de tabellen VI-XI en VI-XII afgeleid. Het verloop van de aktivatiepercentages uit tabel VI-X en weergegeven in grafiek VI-B vertoont een vrij grillig patroon. Opvallend is wel dat na incubatie in het medium met de laagste osmotische waarde het aktivatiepercentage bij toenemende incubatietijd duidelijk afneemt. Kennelijk zijn de eicellen niet bestand tegen incubatie gedurende langere tijd in zo'n sterk afwijkend osmotisch milieu.

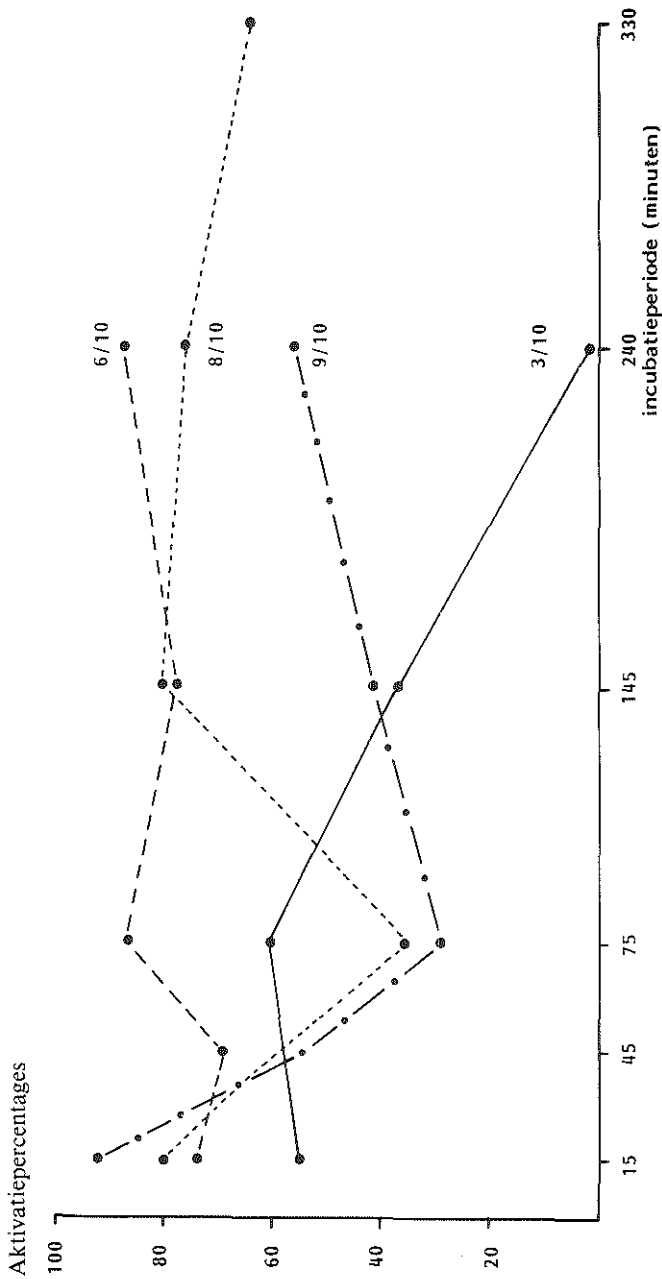
Bij de korte incubatie van 15 minuten is het opvallend dat een steeds hoger percentage haploïde parthenogenonten wordt verkregen naarmate de incubatie in een minder verdund medium heeft plaatsgevonden. Dit verschijnsel vinden we niet bij de andere typen parthenogenonten. Wel is het zo dat er meer diploïde parthenogenonten ontstaan indien men een langere incubatieperiode in acht neemt, althans 75 minuten of langer.

Tevens valt op dat bij alle gehanteerde incubatieperiodes er bij het 6/10 medium bijna steeds het grootste percentage diploïde parthenogenonten ontstaan; slechts bij 75 minuten' in 3/10 medium treft men 3% meer diploïde parthenogenonten aan dan bij 6/10 medium. Hetzelfde geldt voor het percentage i.c. parthenogenonten. Voor dit type vindt men alleen bij 15 minuten en 3/10 een hoger percentage dan bij 6/10.

De hoogste percentages haploïde -, diploïde - en i.c. parthenogenonten verkrijgt men achtereenvolgens bij 15 minuten in 9/10; 75 minuten in 6/10 en 145 minuten in 6/10.

Ten aanzien van de verdere in vitro ontwikkeling kan vermeld worden dat een zeer groot gedeelte van de parthenogenonten in de ontwikkeling blijft steken tussen het twee- en het viercellig stadium. Ook bij deze doorgroeï-experimenten is het echter





Grafiek VI - B Aktivatiepercentages van eicellen na incubatie in verschillende verdunde media gedurende zes incubatieperioden.

Tabel VI-X. (blad I). Het effect van de incubatietijd van eicellen in media met verschillende osmotische waarden op de verkregen aktivatiepercentages van de verschillende typen parthenogenonten en de verdere in vitro ontwikkeling van deze geaktiveerde eicellen.

HP-concentratie	Incub. tijd (min.)	Type parth.	Aantal parth. eicellen	Aantal geincub. eicellen	Aktiv. perc.	In vitro ontwikkeling									
						2-cellig		4-cellig		Morula		Blastocyst			
						n	A.P. R.P.	n	A.P. R.P.	n	A.P. R.P.	n	A.P. R.P.		
3/10	15	2pb1pn	44/144	31	35	24%	80%	2	2%	5%	2	2%	5%	0	0
	75		0/97	0											
	145		0/121	0											
	240		0/114	0											
	15	1pn of	14/144	10	12	8%	86%	4	3%	29%	4	3%	29%	2	1%
	75	2pn	50/97	52	43	44%	86%	4	4%	8%	4	4%	8%	2	2%
	145		45/121	37	1	1%	2%	0							4%
	240		5/114	4	0										
	15	i.c.	21/144	15	—	—	—	6	4%	29%	1	1%	5%	1	1%
	75		8/97	8	—	—	—	0							5%
	145		0/121	0	—	—	—	0							
	240		1/114	1	—	—	—	0							

6/10	15	2pb1pn	54/98	55	47	48%	87%	5	5%	9%	3	3%	6%	1	1%	2%
	45		53/126	42	40	32%	75%	1	1%	2%	0					
	75		24/191	13	17	9%	71%	0								
	145		2/98	2	1	1%	50%	0								
	240		1/85	1	1	1%	100%	0								
	15	1pn of	15/98	15	13	13%	87%	9	9%	60%	6	6%	40%	3	3%	20%
	45	2pn	16/126	13	16	13%	100%	5	4%	31%	3	2%	19%	2	2%	13%
	75		94/191	49	80	42%	85%	16	8%	17%	8	4%	9%	3	2%	3%
	145		64/98	65	52	53%	81%	7	7%	11%	4	4%	6%	1	1%	2%
	240		53/85	62	30	35%	57%	1	1%	2%	0					
	15	i.c.	4/98	4	—	—	—	1	1%	25%	0					
	45		18/126	14	—	—	—	11	9%	61%	1	1%	6%	0		
	75		46/191	24	—	—	—	13	7%	28%	2	1%	4%	0		
	145		12/98	12	—	—	—	2	2%	17%	0					
	240		20/85	24	—	—	—	1	1%	5%	0					

Tabel VI-X. (blad 2). Het effect van de incubatietijd van eicellen in media met verschillende osmotische waarden op de verkregen aktivatiepercentages van de verschillende typen parthenogononten en de verdere in vitro ontwikkeling van deze geaktiveerde eicellen.

HP- concen- trafie	Incub. tijd (min.)	Type parth. ipn	Aantal parth./ geincub. eicellen	Aktiv. perc.	In vitro ontwikkeling											
					2-cellig		4-cellig		Morula		Blastocyst					
					n	A.P.	R.P.	n	A.P.	R.P.	n	A.P.	R.P.	n	A.P.	R.P.
8/10	15	2pb1pn	42/56	75	32	57%	76%	7	13%	17%	2	4%	5%	1	2%	2%
	75		37/127	29	33	26%	89%	0	0%							
	145		42/84	50	40	48%	95%	0	0%							
	240		47/135	35	40	30%	85%	2	1%	4%	1	1%	2%	0		
	330		57/169	34	39	23%	68%	3	2%	5%	1	1%	2%	0		
	15	1pn of	1/56	2	1	2%	100%	1	2%	100%	0					
	75	2pn	45/127	35	35	28%	78%	6	5%	13%	5	4%	11%	0		
	145		21/84	25	20	24%	95%	3	4%	14%	3	4%	14%	1	1%	5%
	240		51/135	38	42	31%	82%	41	30%	80%	20	15%	39%	10	7%	20%
	330		43/169	25	35	21%	81%	19	11%	44%	6	4%	14%	3	2%	7%
	15	i.c.	2/56	4	—	—	—	0								
	75		12/127	9	—	—	—	5	4%	42%	4	3%	33%	0		
	145		5/84	6	—	—	—	5	6%	100%	1	1%	20%	0		
	240		5/135	4	—	—	—	3	2%	60%	1	1%	20%	0		
	330		9/169	5	—	—	—	1	1%	11%	1	1%	11%	0		

9/10	15-19	2pb1pn	30/37	81	26	70%	87%	2	5%	7%	0	3%	7%	2	2%	3%
	45		59/120	49	43	36%	73%	8	7%	14%	4	—	—	0	—	—
	75		27/103	26	16	15%	59%	0	—	—	0	—	—	0	—	—
	145		31/99	31	25	25%	81%	2	2%	65%	0	—	—	0	—	—
	240		70/189	37	27	14%	39%	1	1%	1%	1	1%	1%	1	1%	1%
	15-19	1pn of	3/37	8	2	5%	67%	0								
	45	2pn	3/120	3	1	1%	33%	1	1%	33%	1	1%	33%	1	1%	33%
	75		2/103	2	2	2%	100%	1	1%	50%	1	1%	50%	0	—	—
	145		4/99	4	4	4%	100%	2	2%	50%	1	1%	25%	1	1%	25%
	240		25/189	13	20	11%	80%	9	5%	36%	6	3%	24%	3	2%	12%
	15-19	i.c.	1/37	3	—	—	—	1	3%	100%	1	3%	100%	0	—	—
	45		3/120	3	—	—	—	3	3%	100%	1	1%	33%	1	1%	33%
	75		1/103	1	—	—	—	0	—	—	0	—	—	—	—	—
	145		6/99	6	—	—	—	3	3%	50%	1	1%	17%	0	—	—
	240		10/189	5	—	—	—	0	—	—	0	—	—	—	—	—

Tabel VI–XI. Totale aktivatiepercentages, onafhankelijk van het type parthenogenont, van eicellen na incubatie in media met verschillende osmotische waarden en na verschillende incubatieperioden.

HP – concentratie	Incubatieperiode (in minuten)					
	15	45	75	145	240	330
3/10	56%	—	60%	37%	1%	—
6/10	74%	69%	86%	78%	87%	—
8/10	80%	—	35%	80%	76%	64%
9/10	92%	54%	29%	41%	56%	—

Tabel VI-XII. Naar type parthenogenont gedifferentieerde aktivatiepercentages van eicellen na incubatie in verschillend verdunde media gedurende zes verschillende incubatieperioden.

Parth. type	H.P.- concentratie	Incubatietijd (minuten)					
		15	45	75	145	240	330
2pb1pn	3/10	31%	—	0%	0%	0%	—
	6/10	55%	42%	13%	2%	1%	—
	8/10	75%	—	29%	50%	35%	34%
	9/10	81%	49%	26%	31%	37%	—
1pn of 2pn	3/10	10%	—	52%	37%	4%	—
	6/10	15%	13%	49%	65%	62%	—
	8/10	2%	—	35%	25%	38%	25%
	9/10	8%	3%	2%	4%	13%	—
i.c.	3/10	15%	—	8%	0%	1%	—
	6/10	4%	14%	24%	12%	24%	—
	8/10	4%	—	9%	6%	4%	5%
	9/10	3%	3%	1%	6%	5%	—

zeer duidelijk dat de diploïde parthenogenonten vitaler zijn dan de haploïde. Een opvallend hoog percentage (39%) diploïde morula's werd verkregen na incubatie gedurende 240 minuten in 8/10 medium en gedurende 15 minuten in 6/10 medium (40%); de absolute percentages bedroegen resp. 15 en 6%.

### VI – 3.3 De invloed van de post – ovulatoire leeftijd van de eicellen bij een constante incubatieperiode en een gelijk aktivatiemedium

In tabel VI – XIII staan de resultaten vermeld van experimenten welke de invloed van de "ouderdom" van de eicel, dat wil zeggen het tijdsinterval tussen de ovulatie en de aktivatie, weergegeven op het totale percentage verkregen parthenogenonten en de onderscheidenlijke percentages van de verschillende typen parthenogenonten. Alle experimenten werden uitgevoerd in 6/10 medium; incubatietijd 2h30'. Na deze incubatieperiode werden de eicellen door middel van een zo kort mogelijke hyaluronidasebehandeling ontdaan van de omringende cumuluscellen zodat het parthenogenonttype kon worden vastgesteld. De resultaten uit tabel VI – XIII zijn grafisch weergegeven in grafiek VI – C.

De hoogste aktivatiepercentages vinden we in de leeftijdsgroepen van 6 tot en met 9 uur; het percentage varieert tussen 75% en 85%. Bij oudere eicellen neemt dit percentage geleidelijk af, in de groep van 17 – 21 uur varieert het nog van 53% – 58%, bij 27 uur na ovulatie verkrijgt men nog maar 17% aktivatie terwijl er bij oudere eicellen geen aktivatie meer mogelijk is. Wanneer men de totale aktivatiepercentages echter splitst naar parthenogenonttype dan krijgt men echter een ander beeld. Grafiek VI – d geeft drie verschillende optima voor de haploïde – , diploïde – en i.c. parthenogenonten. Deze optima liggen achtereenvolgens in de leeftijdsgroepen van 7 uur, 6 uur en 21 uur. Dat de leeftijd voor het optimum voor immediale cleavage parthenogenonten zoveel afwijkt ten opzichte van de twee andere typen kan verklaard worden door een waarneming van Szollosi (1971). Deze nam bij de bestudering van de in vivo verandering van onbevuchte eicellen morfologische veranderingen waar. De meest opvallende verandering was de rotatie van de kernspoel en de migratie van de periferie naar het midden van de eicel. Ook door andere onderzoekers werd aangetoond dat de leeftijd van de eicel ten tijde van de aktivatie een duidelijke invloed heeft op het type parthenogenont dat men induceert. In 1973 toonde Kaufman reeds aan (Kaufman, 1973) dat het i.c. type nagenoeg uitsluitend verkregen werd bij oudere eicellen (25 uur na HCG injectie) indien uitsluitend met hyaluronidase werd geactiveerd (tabel VI – XIV).

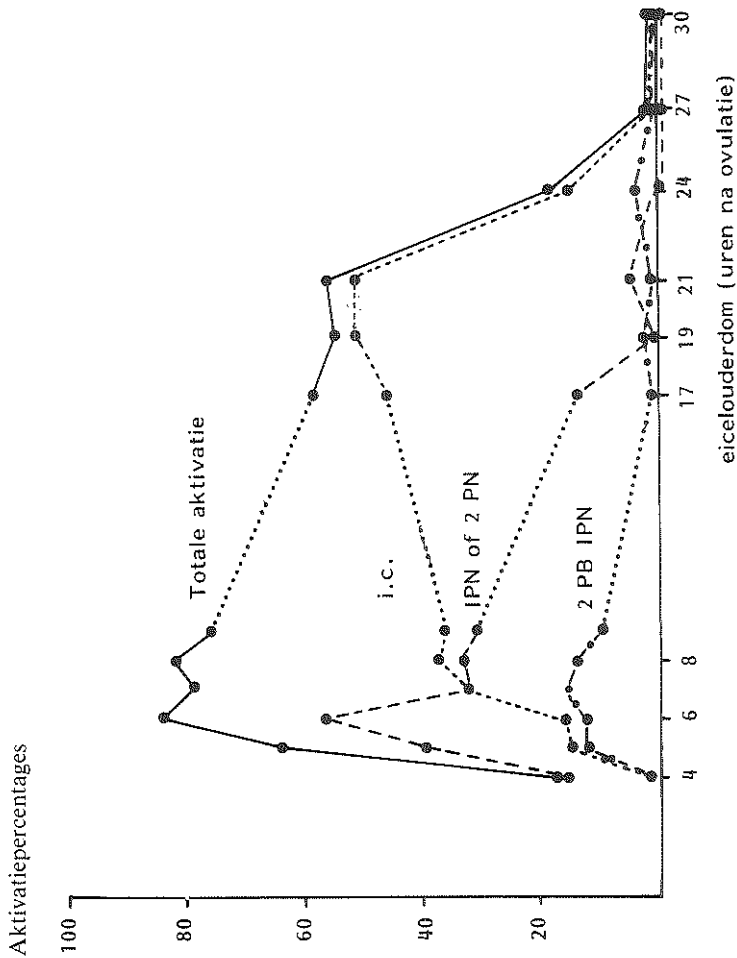
Een jaar later beschreef hij samen met Surani (Kaufman & Surani, 1974) de resultaten van soortgelijke experimenten, in deze proeven werden de eicellen na de hyaluronidasebehandeling echter niet in normaal, 1/1, medium verder gekweekt maar in 3/5 medium. Dit medium komt overeen met de verdunning die voor de hier beschreven experimenten is gebruikt.

Tabel VI-XIII. Aktivatie-percentages en differentiatiepatroon van geaktiveerde eicellen geëxplanteerd op verschillende tijdstippen na spontane of (geïnduceerde) super-ovulatie (\*) (Aktivatie in 6/10 medium gedurende 2 uur en 30 minuten; na deze periode werden de eicellen van de omringende cumuluscellen ontdaan door een hyaluronidase behandeling).

Eicel- ouderdom (in uren)	Aantal geïsoleerde eicellen	Aantal geaktiv. eicellen	Aktivatie perc.	Type selectie na aktivatie									
				2pb1pn		1pn of 2pn		i.c.					
				n	R.P.	A.P.	n	R.P.	A.P.	n	R.P.	A.P.	
4*	144	25	17	1	4%	1%	21	81%	15%	3	12%	2%	
5	137	88	64	16	18%	12%	53	60%	39%	19	22%	14%	
6*	102	82	80	10	12%	10%	70	85%	69%	2	2%	2%	
6	295	252	85	37	15%	13%	153	61%	52%	62	25%	21%	
7	137	108	79	20	19%	15%	44	41%	32%	44	41%	32%	
(1)	104	85	82	13	15%	13%	34	40%	33%	38	45%	37%	
9	106	79	75	13	11%	9%	32	41%	30%	38	48%	36%	
17*	94	54	58	0	0%	0%	12	22%	13%	42	78%	45%	
19*	119	63	53	2	3%	2%	0	0%	0%	61	97%	51%	
21*	74	41	55	0	0%	0%	3	7%	4%	38	92%	51%	
24*	36	6	17	1	17%	3%	0	0%	0%	5	83%	14%	
27*	28	0	0	0	0%	0%	0	0%	0%	0	0%	0%	
30*	36	0	0	0	0%	0%	0	0%	0%	0	0%	0%	
(6-9	(642)	524	82	83	16%	13%	263	50%	41%	182	35%	28%	
6)	(397)	(334)	84	47	14%	12%	223	67%	56%	64	18%	16%	
Totaal:	1412	883		113			422			352			

A.P. en R.P. zijn absolute en relatieve percentages, dat wil zeggen ten opzichte van respectievelijk het aantal geïsoleerde en het aantal geaktiveerde eicellen.





Grafiek VI - C Aktivatiepercentages en differentiatiëpatroon van geactiveerde eicellen geëxplanteerd op verschillende tijdstippen na ovulatie. (Incubatie gedurende 2 uur en 30 minuten in 6/10 medium)

Tabel VI–XIV. Aktivatie van eicellen gedurende 10 minuten in een hyaluronidase – oplossing (100 I.E./ml) en verdere kweek in 1/1 medium (Kaufman, 1974)

(\* Inclusief 6% gefragmenteerde eicellen na 6 uur kweek)

Eicelouderdom (uren na ovulatie)	n	2pb1pn	2pn	i.c.	totaal
2	172	0%	0%	0%	0%
4	211	26,5%	0,5%	0%	27,0%
6	117	76,1%	0%	0%	76,1%
8	137	81,7%	1,5%	0,7%	83,9%
6–9	689	70,1%	0,6%	1,3%	72,0%
13	(* )406	23,6%	3,2%	44,1%	70,9%

van de eicellen meer diploïde of i.c. parthenogenonten. Hypotoon medium heeft dus waarschijnlijk een migratie van de kernspoel van de tweede meiotische deling tot gevolg.

Deze methode verdient dus de voorkeur indien men een hogere opbrengst diploïde parthenogenonten van jonge eicellen wil verkrijgen. Als zodanig is de hier gevolgde aktivatiemethode dan ook een verbetering van de differentiatiemogelijkheden naast de reeds bestaande mogelijkheid een hoog percentage haploïde parthenogenonten te verkrijgen door uitsluitend een hyaluronidasebehandeling toe te passen zonder verdere incubatie in hypotoon medium (Kaufman, 1973).

In tabel VI–XVIII is de verdere in vitro ontwikkeling weergegeven van de verschillende typen parthenogenonten welke waren verkregen na incubatie in 6/10 medium gedurende 2uur en 30 minuten. Daarna werden de cumuluscellen verwijderd door middel van een zo kort mogelijke hyaluronidasebehandeling. De ontwikkeling is uitsluitend gevolgd bij de parthenogenonten welke 6 en 21 uur na ovulatie geactiveerd werden. Bovendien werd in de eerste groep onderscheid gemaakt tussen spontaan geovuleerde eicellen en eicellen afkomstig van superovulaties welke door PMS – HCG injecties geïnduceerd werden.

Het is opvallend dat er geen of slechts kleine verschillen zijn in de verdere in vitro ontwikkeling van deze twee groepen.

#### VI - 4 Conclusies

Uit de resultaten van de in dit hoofdstuk uitgevoerde experimenten kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- 1) incubatie van eicellen in hypotoon medium heeft bij zes van de acht onderzochte verdunningen een kwantitatief vergelijkbare aktivatie tot gevolg. Er treden echter grote kwalitatieve verschillen op: bij gelijke incubatieperiode wordt bij drie verschillende verdunningen een optimum aktivatiepercentage voor een bepaald type parthenonont verkregen.

2) de invloed van de lengte van aktivatieperiode op het totale aktivatiepercentage hangt af van de verdunning van het aktivatie-medium. Een incubatietijd van 15 minuten heeft voor de vier onderzochte verdunningen steeds een hoog aktivatiepercentage tot gevolg. Bij een langere aktivatieperiode blijft dit percentage voor de 6/10 en 8/10 verdunningen nagenoeg constant. De sterk verdunde oplossing, (3/10), geeft een afnemend aktivatiepercentage bij langere aktivatie. De bijna onverdunde oplossing, (9/10), heeft aanvankelijk een aktivatiepercentage tot gevolg. Dit percentage neemt bij een langere incubatieperiode (langer dan 75 minuten) echter weer geleidelijk toe. Wanneer we een bepaald type parthenogenont bekijken dan blijken er echter wel verschillen te zijn in de optimale aktivatieperiode.

De haploïde parthenogenonten type 2pb1pn hebben bij alle onderzochte verdunningen een maximale aktivatie bij de kortste incubatieperiode (15 minuten). Bij de diploïde parthenogenonten, type 1pn of 2pn, is dat juist andersom: een korte incubatieperiode geeft een lage opbrengst terwijl die bij langere aktivatie (bij de sterker verdunde oplossingen minder lang) toeneemt. Hetzelfde geldt voor de haploïde parthenogenonten type i.c. met dien verstande dat er wel bij de meest verdunde oplossing een maximale opbrengst wordt verkregen bij de kortste aktivatieperiode.

3) de leeftijd van de eicellen, de periode tussen de ovulatie en de aktivatie, heeft een duidelijke invloed op zowel het totale aktivatiepercentage alsmede op het differentiatiepatroon van de geïnduceerde parthenogenonten. Zeer duidelijk blijkt dat de i.c. parthenogenonten in hoofdzaak uit andere eicellen ontstaan (17-19 uur) terwijl de diploïde parthenogenonten juist uit de jongere eicellen ontstaan (6 uur). De haploïde parthenogenonten type 2pb1pn zijn minder gevoelig voor de ouderdom, zij komen vooral, zonder duidelijk optimum, voor tussen de 5-9 uur oude eicellen.

Resumerend kan worden geconcludeerd dat de drie onderzochte variabelen — de verdunning van het aktivatiemedium, de lengte van de aktivatieperiode en de leeftijd van de eicellen — een duidelijke invloed uitoefenen op het totale aktivatiepercentage en het differentiatiepatroon van de geïnduceerde parthenogenont-typen.

Eveneens in 1974 onderzochten Graham & Deussen (1974) op dezelfde wijze de invloed van de post-ovulatoire leeftijd van eicellen op het type parthenogenont. De door hen verkregen resultaten staan gedeeltelijk samengevat in tabel VI – XVI.

Tabel VI – XVI. Aktivatie van eicellen gedurende 10 – 15 minuten in circa 100 I.E./ml. hyaluronidase-oplossing en verdere kweek gedurende 1h50' – 2h15' in 3/5 medium (Graham & Deussen, 1974). R.P. is het relatieve percentage, dat wil zeggen ten opzichte van het aantal geaktiveerde eicellen.

Eicelouderdom (uren na ovulatie)	n (totaal)	R.P. 2pb1pn	R.P. 2pn of 1pn	R.P. i.c.
1 – 4	56	26,7%	69,6%	3,7%
5 – 8	197	37,1%	38,0%	24,9%
9 – 12	77	19,5%	45,0%	35,5%

Het is jammer dat Graham & Deussen geen exakte aktivatiepercentages geven; zij vermeldden slechts dat bij eicellen jonger dan 4 uur 20 – 50% werd geaktiveerd; in de overige leeftijdsgroepen 70 – 90%.

Wanneer we de resultaten van dit onderzoek vergelijken met de resultaten van overeenkomstige experimenten van Kaufman & Surani (1974) en van Graham & Deussen (1974) dan blijken er grote verschillen te zijn (tabel VI – XVII).

Tabel VI – XVII. Effect van de post-ovulatoire leeftijd van eicellen op de parthenogenonttype bepaling na hyaluronidase – aktivatie en verdere incubatie in 3/5 medium. (K&S: Kaufman & Surani, 1974; G&D: Graham & Deussen, 1974; vM: van Marle, de hier beschreven resultaten.)

Eicelouderdom (uren na ovulatie)	2pb 1pn			1pn 2pn			i.c.		
	K&S	G&D	vM	K&S	G&D	vM	K&S	G&D	vM
3,25	0		100			0			
1 – 4		26,7			69,6			3,7	
4			4			84			12
5			18			60			22
5 – 8		37,1			38,0			24,9	
5 – 8			15,6			57,6			26,8
8 – 9	30			58			12		
8 – 9			15,5			39,3			45,2
9 – 12		19,5			45,0			35,5	
9			11			41			48
13,5	22			50			28		
17			0			22			78

De percentageverschillen blijken met name in de verdeling haploïde – diploïde parthenogenonten te zitten. Het percentage haploïde parthenogenonten in het eigen onderzoek ligt 9 – 20% lager dan de door Kaufman & Surani en Graham & Deussen verkregen resultaten. Het percentage diploïde parthenogenonten ligt in de jongere groepen 15 – 20% hoger; bij oudere eicellen (ouder dan 8 uur) neemt dit verschil af en neemt het percentage i.c. sterk toe (13 – 15%).

Wanneer we ervan uitgaan dat de incubatie in 3/5 medium geen effect heeft op de type – bepaling indien aansluitend een hyaluronidasebehandeling wordt gegeven, met andere woorden de eicellen zijn in wezen alleen in vitro verouderd, dan zouden we de resultaten van de diverse leeftijds groepen van dit onderzoek kunnen vergelijken met leeftijds groepen van circa 2,5 uur ouder.

Uit de gegevens van tabel VI – XV lijkt de conclusie voor de hand te liggen dat een hyaluronidaseprikkel met name de inductie van haploïde parthenogenonten tot gevolg heeft waarna een beperkt gedeelte later, in de aansluitende incubatie in hypotoon medium, alsnog in diploïde parthenogenonten resulteert. Worden de eicellen echter eerst aan dit hypotone incubatiemedium blootgesteld dan verkrijgt men aanzienlijk minder haploïde parthenogenonten, afhankelijk van de ouderdom

Tabel VI-XVIII. Ontwikkeling in vitro van parthenogenonten geactiveerd door incubatie in 6/10 medium gedurende 2 uur en 30 minuten, direct gevolgd door een hyaluronidase-behandeling teneinde de cumuluscellen van de eicellen te verwijderen.

Type parthenogenont	Eicel-ouderdom (in uren)	Aantal parthenogenonten	In vitro ontwikkeling											
			2-cellig			4-cellig			Morula			Blastocyst		
			n	R.P.	A.P.	n	R.P.	A.P.	n	R.P.	A.P.	n	R.P.	A.P.
2pn1pn	6	22	18	82%	9%	5	23%	3%	1	5%	1%	0	—	—
	6*	10	5	50%	10%	1	10%	1%	1	10%	1%	0	—	—
	21*	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1pn2pn	6	109	96	88%	50%	57	52%	30%	36	33%	19%	9	8%	5%
	6*	70	57	81%	56%	24	34%	24%	19	27%	19%	12	17%	12%
	21*	3	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
i.c.	6	36	(36)	(100%)	(100%)	23	64%	12%	1	3%	1%	0	—	—
	6*	2	(2)	(100%)	(100%)	1	50%	1%	0	—	—	0	—	—
	21*	38	(38)	(100%)	(100%)	1	3%	1%	0	—	—	0	—	—

(\* explantatie na super-ovulatie)

## HOOFDSTUK VII

### IN VITRO BEVRUCHTING VAN PARTHENOGENONTEN

#### VII – 1 Inleiding

De bevruchting van zoogdiereicellen is een zeer complex proces waarbij verschillende mechanismen een rol spelen (Bedford, 1972; Austin, 1972; Gwatkin, 1977; Edwards, 1981). Resultaten van elektronenmicroscopisch onderzoek op dit gebied zijn onder andere weergegeven in twee atlassen: Hadek (1969) en Zamboni (1971).

Alvorens de zaadcel een eicel kan bevruchten moeten zaadcellen een specifieke rijping (capacitatie) ondergaan welke normaal in het vrouwelijke organisme (vagina, uterus en oviduct) plaatsvindt. Slechts wanneer deze rijping heeft plaatsgevonden kan bij de zaadcel de zogenaamde acrosoomreactie optreden. Dit is een structurele verandering in de dubbele membraan welke rond de kop van de zaadcel zit. De binnenste en buitenste membraan fuseren op bepaalde plaatsen waardoor de inhoud, hoofdzakelijk bestaande uit het enzym hyaluronidase, naar buiten komt. Dit enzym heeft een oplossende werking op de gelei – achtige massa welke zich tussen de cumuluscellen, die de eicel omgeven, bevindt. Hierdoor kan de zaadcel deze cumulusmassa doordringen en de buitenkant van de eicel, de zona pellucida, bereiken. Het op de binnenste acrosoommembraan aanwezige lysine maakt het door haar oplossend vermogen mogelijk deze buitenste bescherm laag van de eicel te doordringen. Daarna komt de zaadcel in een smalle, met vocht gevulde ruimte tussen de eicelmembraan (de vitelline membraan) en de zona pellucida: de zogenaamde perivitelline ruimte. Via deze ruimte komt de zaadcel bij de eicelmembraan. De zaadcel gaat als het ware tegen de membraan aanliggen en "versmelt" hiermee, waarna de zaadcel zijn genetische en mogelijk cytoplasmatische bijdrage aan de bevruchting en verdere ontwikkeling kan leveren.

Voor deze genetische – en cytoplasmatische bijdrage oefent de bevruchtende zaadcel echter een aktiverende invloed uit op de eicel. Deze eicelaktivatie moet voorkomen dat de eicel door meerdere zaadcellen bevrucht wordt. Bevruchting door slechts één zaadcel is bij zoogdieren een absolute voorwaarde voor een normale embryonale ontwikkeling. Meervoudige bevruchting, polyspermie, leidt onherroepelijk tot een abnormale ontwikkeling en/of embryonale dood (Austin, 1963, 1965, 1969; Austin & Bishop, 1957; Beatty, 1961; Bomsel – Helmreich, 1965; Piko, 1961).

Hoewel de rol van de vrouwelijke voortplantingskanalen in het reduceren van

kansen op polyspermie al sedert vele jaren benadrukt is (Chang & Pincus, 1951; Austin & Braden, 1952; Braden, 1953; Braden & Austin, 1954; Austin, 1964) en men tevens de aandacht heeft gevestigd op de vermeende functie die de cumuluscellen vervullen in het reguleren van het aantal zaadcellen dat de oppervlakte van de eicel bereikt (Chang & Pincus, 1951; Austin, 1961) vindt de uiteindelijke polyspermie – blokkade toch binnen de zona plaats (Rothschild, 1954; Szollosi, 1967; Gwatkin, 1976 en 1977; Austin, 1978; Monroy & Moscona, 1979; Dale & Monroy, 1981).

Binnen de zona kan de polyspermie – blokkade op verschillende plaatsen gelokaliseerd zijn. Bij konijne – eicellen bevindt deze zich in de eicelmembraan (Braden et al. 1954; Yanagimachi, 1978), bij schapen en varkens in de zona pellucida (Austin, 1965) terwijl bij de rat en de muis op deze beide plaatsen een blokkade aanwezig is (Austin, 1965).

Over de aard van het blokkeringsmechanisme zijn verschillende opvattingen onderwerp van discussie. Tegenwoordig wordt vrij algemeen aangenomen dat de polyspermie – blokkade in eerste instantie een direkt gevolg is van de interactie tussen de zaadcel en de eicel, hetgeen onder andere resulteert in de zogenaamde corticale reactie. Deze reactie is een rechtstreeks gevolg van de fusie tussen de zaadcel – en de eicelmembraan en resulteert in het fuseren van de corticale granulae met de eicelmembraan (Austin & Braden, 1956) waardoor de inhoud van deze granulae uitgestort wordt in de ruimte tussen de eicelmembraan en de zona pellucida, de perivitelline ruimte. Corticale granulae (overzichtsartikelen: Gulyas, 1980 en Schuel, 1978) zijn kleine ronde, door een membraan omgeven celorganellen, welke zich gewoonlijk vlak onder de membraan van onbevuchte eicellen bevinden. Sommige onderzoekers veronderstellen dat de blokkade berust op een verandering in de inherente eigenschappen van de zona pellucida (Barros & Yanagimachi, 1971) terwijl andere van mening zijn dat de zona pellucida geïmpregneerd wordt door een vrijgekomen enzymremmer die de lysine uit de kop van de zaadcel inaktiveert zodat er geen penetratie meer kan plaatsvinden (Conrad et al., 1971).

Weer andere veronderstellen dat de zona beïnvloed wordt door een protease dat de zaadcelreceptoren van de zona pellucida vernietigt (Gwatkin et al., 1973).

Er is eveneens veel variatie in het moment waarop de polyspermie – blokkade is voltooid. Het verschil hangt waarschijnlijk samen met de noodzaak een snelle blokkade te realiseren bij dieren waar een zeer groot aantal zaadcellen de eicel bereikt, bijvoorbeeld bij veel ongewervelde zeedieren. Bij de zoogdieren komen slechts een paar zaadcellen in contact met de zona (Bedford, 1972) en duurt het tot stand komen van zo'n blokkade aanzienlijk langer (Barros & Yanagimachi, 1972; Bedford, 1968; Fraser et al., 1972; Sato, 1979). Bovendien is er bij zoogdieren waarschijnlijk sprake van een samengesteld mechanisme bestaande uit een zogenaamde "vroeg, onvolledige polyspermie – blokkade en een vertraagde, absolute blokkade (Rothschild, 1954; Bedford, 1968; Fraser et al., 1972). Bij

hamstereicellen is de zona – reactie bijvoorbeeld al na 15 minuten effectief terwijl de membraanreactie pas na 2 tot 3,5 uur is voltooid (Barros & Yanagimachi, 1972). In de eicel komen twee populaties corticale granulæ voor: de eerste bevindt zich onmiddellijk onder de eicelmembraan en de andere is verspreid in de daaronderliggende regionen (Gulyas, 1976; Nicosia et al., 1977). Er zijn indicaties dat alleen de eerstgenoemde populatie betrokken is bij de corticale reactie. De andere, dieper in het cytoplasma gelegen granulæ, blijven intact. Hierdoor is het mogelijk dat men ook in bevruchte eicellen nog corticale granulæ aantreft (Dvorak, 1961; Fléchon et al., 1975; Nicosia et al., 1977).

Interessant is het om na te gaan in hoeverre een parthenogenetische aktivatie overeenkomt of verschilt met een normale eicelaktivatie als gevolg van bevruchting. Mogelijk is een van de redenen waarom parthenogenonten zich zo veel slechter ontwikkelen dan embryo's een gevolg van een pathologische, incomplete eicelaktivatie, bijvoorbeeld door het achterwege blijven van de corticale reactie en de polyspermie – blokkade. Om meer inzicht in deze problematiek te verkrijgen werden de hierna beschreven experimenten uitgevoerd waarin werd nagegaan in hoeverre parthenogenetisch geaktiveerde eicellen alsnog bevrucht kunnen worden en zo ja, in hoeverre dan ook nog een effectieve polyspermie – blokkade tot stand komt, met andere woorden in welke mate er polyspermie wordt aangetroffen.

Mocht blijken dat parthenogenonten inderdaad nog bevrucht kunnen worden dan zou hierdoor tevens een methode gevonden zijn om op eenvoudige wijze grote aantallen chimaere muizen te kunnen verkrijgen uit i.c. – parthenogenonten. Momenteel kan dit type muizen slechts verkregen worden met behulp van zeer verfijnde technieken (Mintz, 1971; Gardner & McLaren, 1974), bijvoorbeeld door het fuseren van 8 – cellige embryo's (Stevens, 1978) of morula's (Graham, 1970) of door het injecteren van embryonale cellen in blastocysten (Ford et al., 1975; Surani et al., 1977; Stevens et al., 1977)

## VII – 2 Materialen en methoden

Eicellen werden 3,5 – 4,5 uur na spontane ovulatie uit de tubae geïsoleerd en gedurende 2 uur en 25 minuten in 4/5 medium geïncubeerd. Na deze periode werden de eicellen met behulp van een hyaluronidase – oplossing van hun cumuluscellen ontdaan (zie IV – 2.13).

Twee tot drie uur na de aktivatiebehandeling werden de parthenogenetisch geaktiveerde eicellen geïsoleerd en geselecteerd naar type aktivatie. Gelijke typen werden, in groepjes van circa 20 stuks, bijeen gebracht in 0,2 ml medium. Daarna werd 0,2 ml zaadcellen – suspensie toegevoegd, teneinde een mogelijke in vitro bevruchting van deze parthenogenonten te induceren.



Na een incubatieperiode van 6,5 – 8 uur in de zaadcellen – suspensie werden de eicellen drie keer gespoeld, om zoveel mogelijk aangehechte spermatozoa te verwijderen en 15 – 20 uur verder geïncubeerd in medium met 0,00001 M colchicine zodat de delende parthenogonoten, al dan niet bevrucht, zich niet voorbij het metafasestadium konden ontwikkelen.

Tenslotte werden chromosoompreparaten gemaakt volgens een methode zoals die beschreven is door Tarkowski (Tarkowski, 1966) (zie IV – 2.14). Parallel aan deze proeven liepen steeds twee blanco experimenten als controle voor de in vitro bevruchting en als controle voor de parthenogenetische activatie. De blanco bevruchtingsexperimenten werden uitgevoerd met 7,25 – 7,75 uur na spontane ovulatie geïsoleerde eicellen. Onmiddellijk na isolatie werden eicellen met behulp van hyaluronidase kaal gemaakt (zie IV – 2.13) en in 0,2 ml medium overgebracht waaraan een gelijk volume spermasuspensie werd toegevoegd. Na 7 – 8 uur werden de eicellen drie keer in medium gespoeld en geïncubeerd in 0,2 ml medium. Een bepaald gedeelte in normaal medium teneinde het klievingspercentage te kunnen bepalen en een ander gedeelte gedurende 15 – 20 uur in medium met 0,00001 M colchicine. Van deze laatste groep werden chromosoompreparaten gemaakt aan de hand waarvan het bevruchtingspercentage berekend kon worden.

De chromosoompreparaten werden in dit geval gemaakt om te kunnen bepalen in hoeverre de, in normaal medium verder gegroeide en gekliefde eicellen, daadwerkelijk bevrucht waren en klieving geen parthenogenetische oorzaak had. Hoewel deze methode het voordeel heeft dat men met exact gedefinieerd parthenogenetisch uitgangsmateriaal werkt (immers de zaadcellensuspensie wordt pas toegevoegd nadat alle eicellen geselecteerd zijn naar het type parthenogenetische activatie) staat hiertegenover dat de geactiveerde eicellen reeds aanzienlijk in vitro verouderd zijn alvorens de mogelijkheid tot bevruchting wordt geïntroduceerd (4,5 – 5,5 uur na explantatie, dus 8 – 10 uur na ovulatie). Hierdoor en door de hyaluronidasebehandeling zal het mogelijke bevruchtingspercentage afnemen.

Om deze bezwaren te ondervangen werd tevens een volgende serie experimenten gedaan met een iets gewijzigde opzet waardoor de in vitro veroudering en de hyaluronidasebehandeling vervangen werd door uitsluitend een in vivo veroudering. Hiertoe werden eicellen 8,75 – 9,75 uur na superovulatie geïsoleerd en gedurende 1 uur en 15 minuten in 6/10 medium geïncubeerd. Onmiddellijk hierna werden ze overgebracht in 0,4 ml zaadcellen – suspensie (dus zonder hyaluronidasebehandeling). Na een incubatieperiode van 9,5 – 10 uur in de zaadcellen – suspensie werden de parthenogenetisch geactiveerde en/of bevruchte eicellen geselecteerd (i.c.; 2 pn, 1 pn of fr. n.; 2pb1pn of 2pb2pn) en gedurende 15 – 20 uren verder gekweekt in medium met 0,00001 M. colchicine. Daarna werden ook van deze groepen chromosoompreparaten gemaakt.

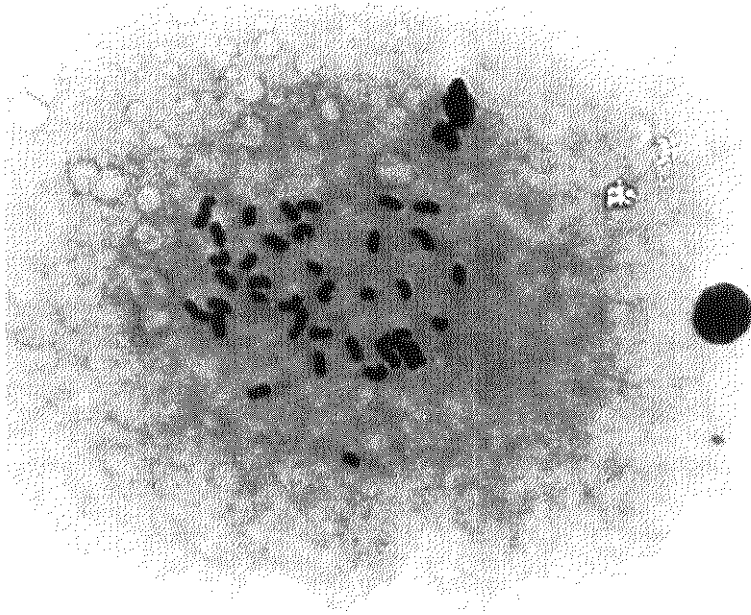


FOTO 9

Deze foto is een illustratie van een normaal bevruchte eicel. Midden boven treft men de chromatinerechten van het eerste poollichaampje aan; rechts op de foto bevindt zich het tweede poollichaampje terwijl de 40 chromosomen (20 van de eicel en 20 van de zaadcel) zich in het linker deel van de foto bevinden.

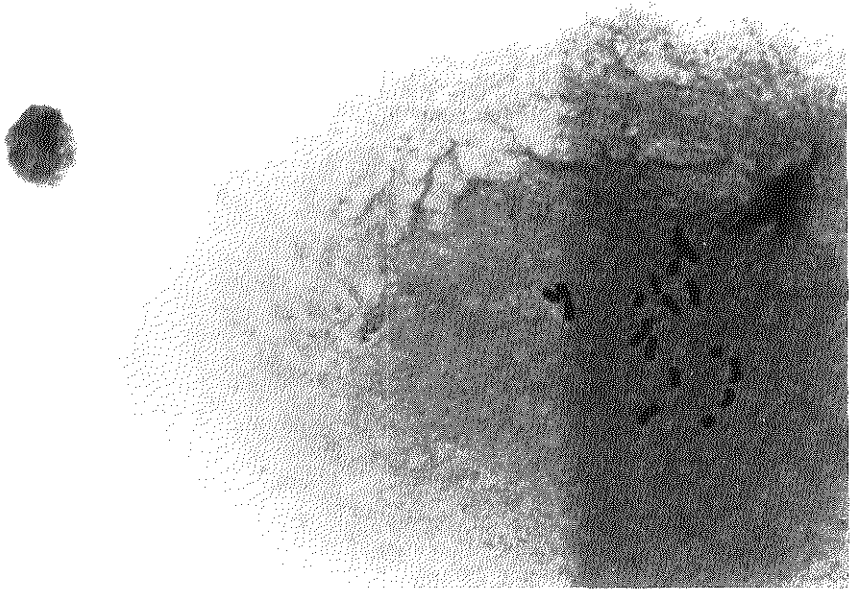


FOTO 10

Foto 10 illustreert het chromosomale beeld van een haploïde parthenogenont. Links op de foto ziet men het tweede poollichaampje en rechts de 20 chromosomen van de eicel (mikroskoopvergroting 40x2,0).

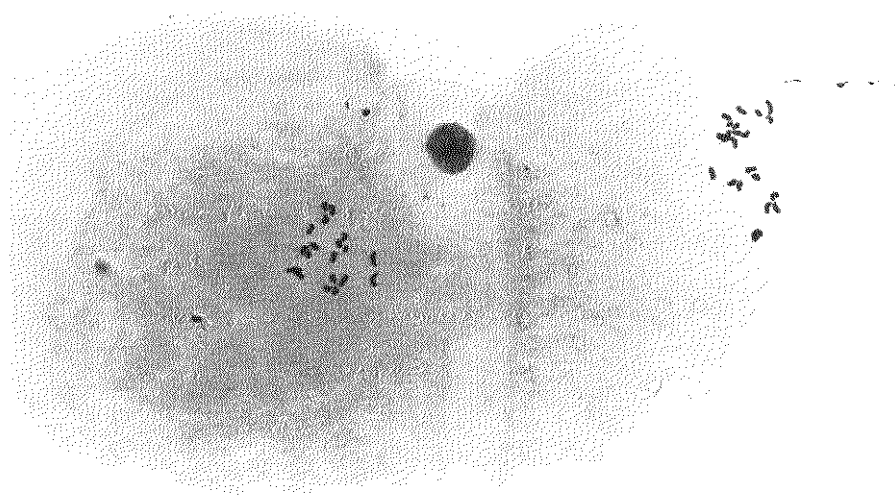


FOTO 11

Ook foto 11 is een beeld van een haploïde parthenogenont type 2pb1pn. Deze parthenogenont is echter eerst verder gekweekt in normaal medium en pas met colchicine behandeld nadat het tweecellig stadium was bereikt. Centraal is het tweede poollichaampje nog duidelijk waarneembaar terwijl links en rechts de twee groepen van 20 chromosomen zijn te onderscheiden, beide groepen uit een van de twee cellen (mikroskoopvergroting 40x1,6).

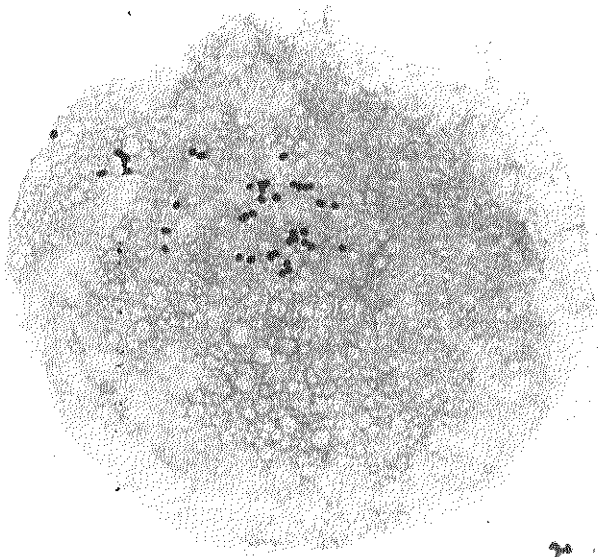


FOTO 12

Foto 12 geeft een beeld van een chromosoompreparaat van een diploïde parthenogonont type 1pn. De 40 chromosomen zijn niet in twee groepen verdeeld en er is geen tweede poollichaampje aanwezig (mikroskoopvergroting 25x2,0).

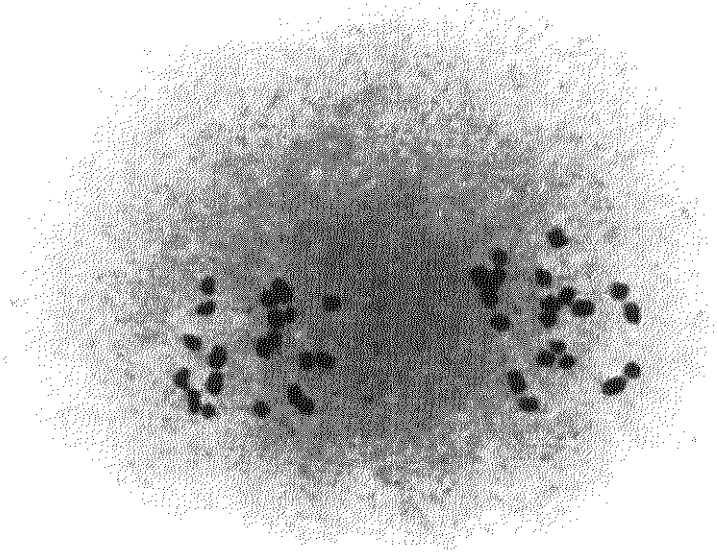


FOTO 13

Foto 13 geeft evenals foto 12 een beeld van een diploide parthenogenont doch nu van het type 2pn in plaats van type 1pn. Duidelijk zijn de twee groepen van elk 20 chromosomen waarneembaar (mikroskoopvergroting 40x2,0).

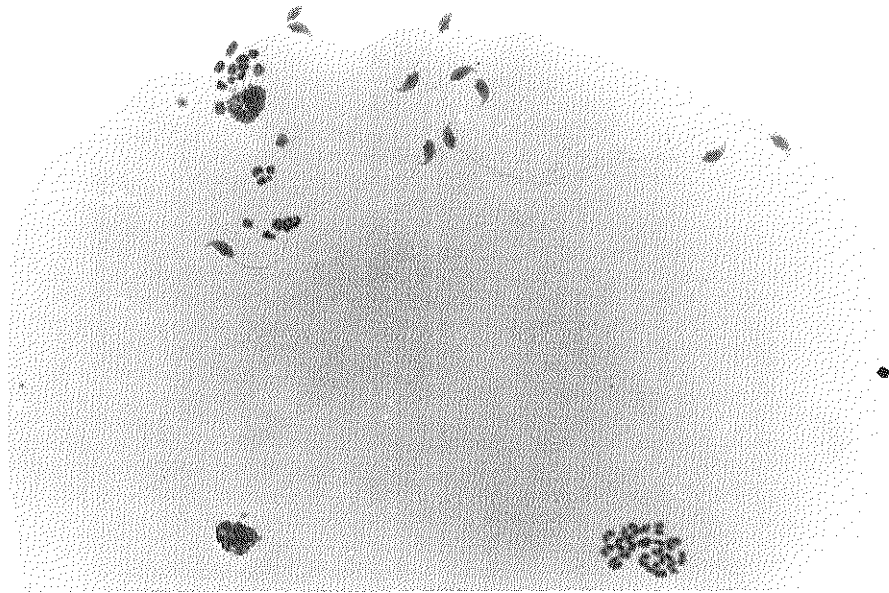


FOTO 14

Foto 14 toont een parthenogenont type i.c. na bevruchting. Duidelijk waarneembaar zijn de beide groepen chromosomen uit twee cellen. Tevens zijn 11 zaadellen zichtbaar die aan de buitenkant van de eicel gehecht waren. Tenslotte zijn twee gepenetreerde en gedeeltelijk getransformeerde zaadcelkoppen te onderscheiden. Gezien de lokatie van deze twee chromatinemassa's ten opzichte van de twee groepen chromosomen lijkt het alsof beide cellen van de i.c.-parthenogenont elk door een zaadcel zijn bevrucht. Bij de chromatinemassa links onder op de foto is de staart van de zaadcel nog duidelijk waarneembaar (mikroskoopvergroting 25x1,6)

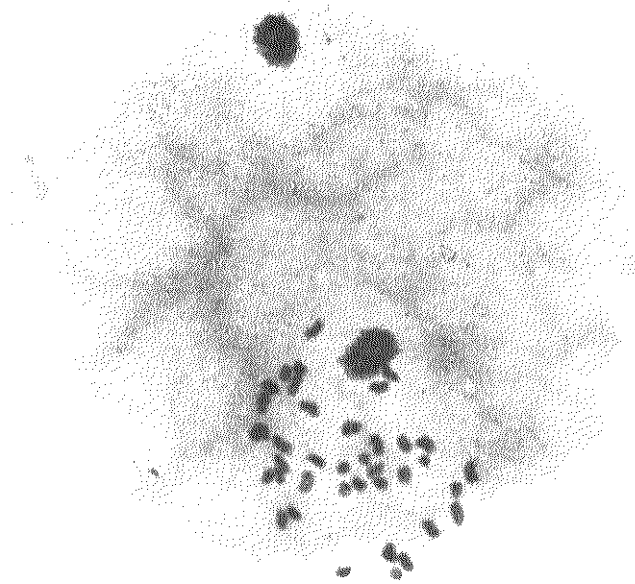


FOTO 15

Foto 15 is een illustratie van een dubbel bevruchte diploïde parthenogenont type 1pn. Behalve de 40 chromosomen zijn de twee gedeeltelijk getransformeerde koppen van de gepenetreerde zaadcellen duidelijk waarneembaar (mikroskoopvergroting 40x1,6).



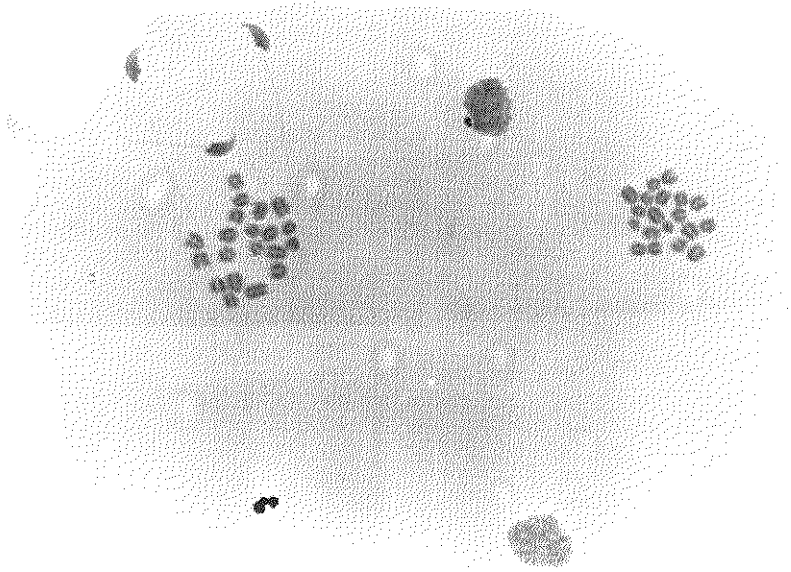


FOTO 16

Evenals bij foto 15 is er ook bij foto 16 sprake van een dubbele bevruchting van een diploïde parthenogenont. Gezien de rangschikking van de chromosomen in twee groepen betreft het hier waarschijnlijk een type  $2pn$  parthenogenont. De groep chromosomen rechts op de foto bestaat slechts uit 19 chromosomen. Het zwarte vlekje links onder is een verontreiniging in het preparaat en heeft geen betekenis (mikroskoopvergroting  $25\times 2,0$ ).

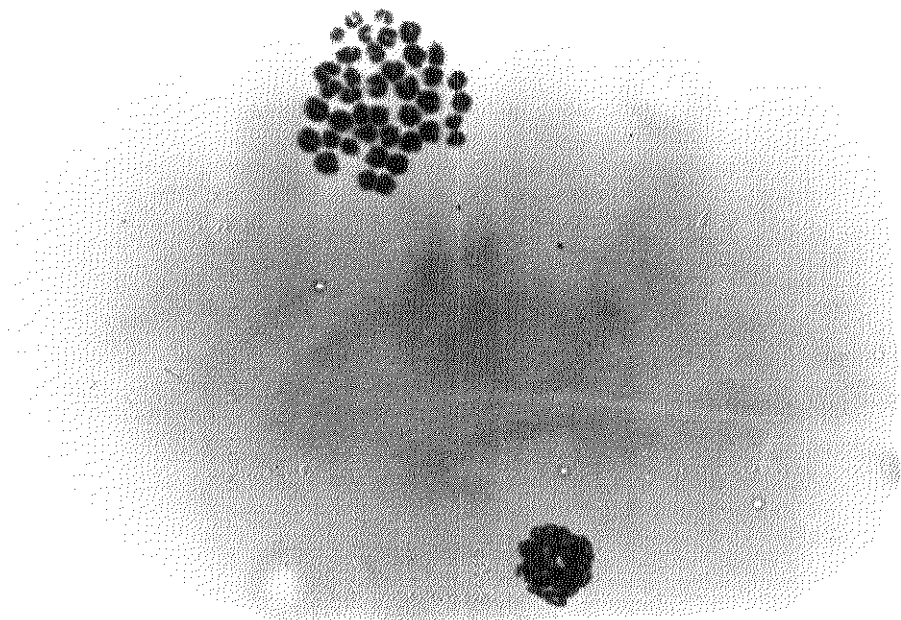


FOTO-17

Foto 17 toont een preparaat van een diploide parthenogenont type 1pn na bevruchting. Bovenaan de foto treft men een duidelijke illustratie aan van 40 chromosomen. Aan de onderzijde bevindt zich een gedeeltelijk getransformeerde kop van een gepenetreerde zaadcel (mikroskoopvergroting 40x2,0).

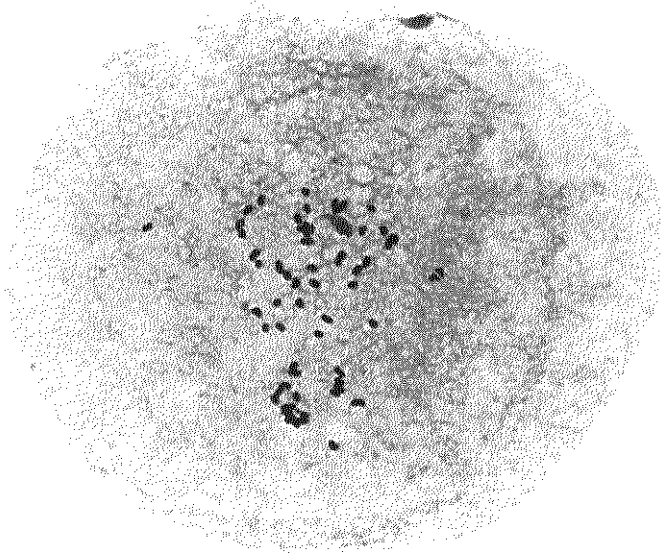


FOTO 18

Foto 18 toont een overzicht van een bevruchte, eencellige, diploïde parthenogenont. Bij deze bevruchting is de kop van de zaadcel volledig getransformeerd tot 20 chromosomen zodat er totaal 60 chromosomen waarneembaar zijn. Foto 19 is een verdere vergroting van de chromosomen (mikroskoopvergroting 25x2,0).

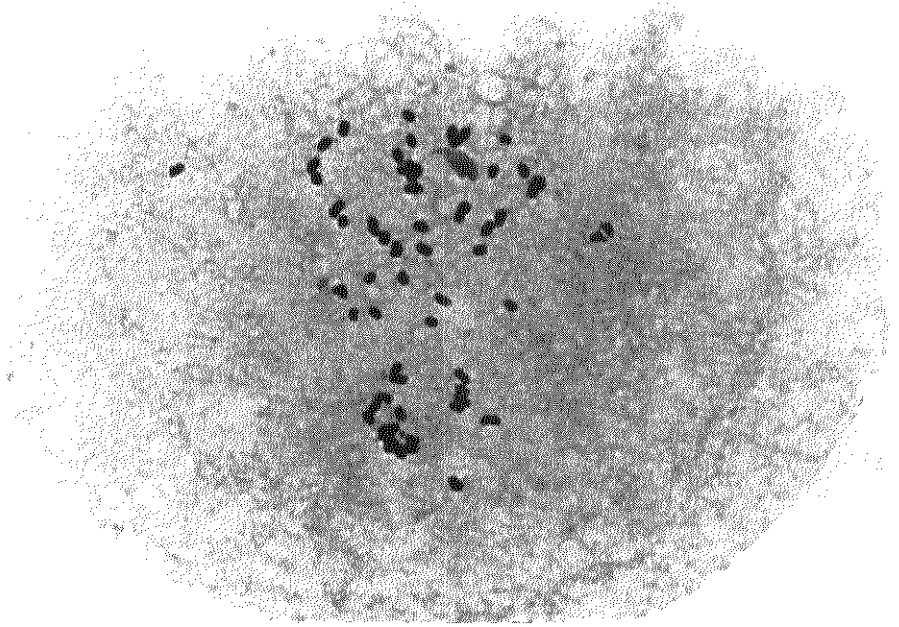


FOTO 19

Foto 19 is een detailopname van foto 18 (mikroskoopvergroting 40x2,0).

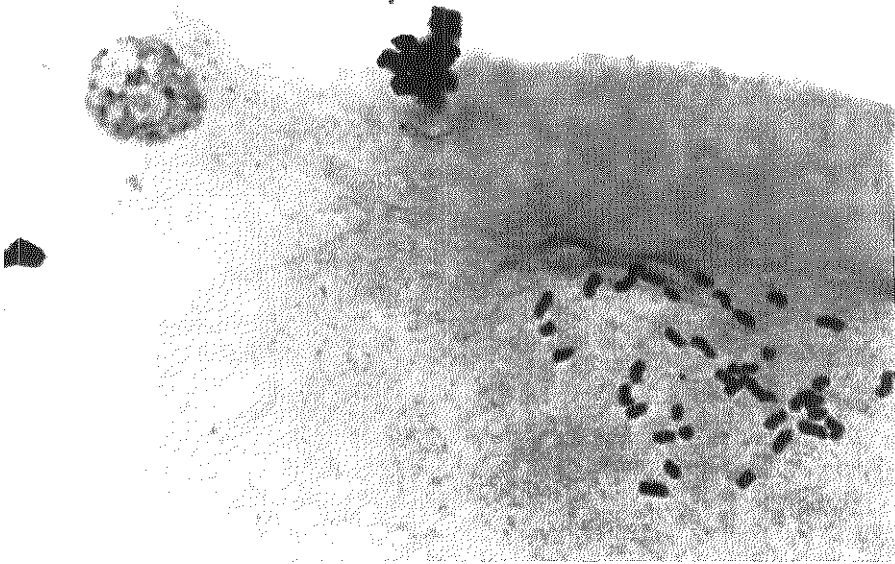


FOTO 20

Foto 20 toont een haploïde parthenogenont type 2pblpn na bevruchting. Evenals bij foto 18 is bij deze bevruchting de kop van de gepenetreerde zaadcel volledig getransformeerd tot 20 chromosomen. In de linkerbovenhoek is het tweede poollichaampje waarneembaar, daarnaast de chromatineresten van het eerste poollichaampje. Rechts onder bevinden zich 20 chromosomen van de eicel en 20 chromosomen van de zaadcel.

Volledigheidshalve wordt er nogmaals op gewezen dat er bij deze bevruchtingsexperimenten eerst parthenogenonttype bepalingen werden gedaan, met andere woorden de pronucleï reeds zichtbaar waren, alvorens de pogingen tot bevruchting werden uitgevoerd (mikroskoopvergroting 40x2,0).

### **VII – 3 Resultaten.**

Alvorens nader wordt ingegaan op de resultaten van de bevruchtingsexperimenten en de daarbij behorende illustraties van chromosoompreparaten van bevruchte parthenogenonten worden allereerst de verschillende chromosoomconfiguraties geïllustreerd van een normaal bevruchte eicel (foto 9), van een eencellige haploïde parthenogenont type 2pb1pn (foto 10) en van een tweecellige parthenogenont van hetzelfde type (foto 11). Tevens worden chromosoompreparaten van twee eencellige diploïde parthenogenonten getoond respectievelijk type 1pn (foto 12) en type 2pn (foto 13).

#### **VII – 3.1 In vitro bevruchting van op type geselecteerde parthenogenonten ontstaan na incubatie in anisotonisch medium en een korte hyaluronidase behandeling.**

De resultaten van de eerste groep experimenten (bevruchting na parthenogenontselectie) staan vermeld in tabel VII – 1. In totaal werden drie aparte experimenten gedaan: I, II en III. Tijdens deze experimenten werden de haploïde (2pb1pn) en diploïde (2pn of 1pn) parthenogenonten apart vervolgd, waardoor er zes experimentele groepen ontstonden: I – ha, II – ha, III – ha, I – di, II – di en III – di.

Uit deze resultaten valt onmiddellijk het verschil op tussen de bevruchtingspercentages van de haploïde en de diploïde parthenogenonten. Van de diploïde parthenogenonten werd er niet een bevrucht, terwijl er bij de haploïde parthenogenonten 7% werd bevrucht. De bevruchtingspercentages in de controlegroepen (29% – 55%) zijn lager dan gewoonlijk (70% – 100%). Dit wordt mogelijk veroorzaakt door de voor de bevruchting toegepaste hyaluronidasebehandeling en door de ouderdom van de eicellen.

#### **VII – 3.2 In vitro bevruchting van ongeselecteerde parthenogenonten en eicellen onmiddellijk aansluitend op een korte parthenogenetische aktivatie in anisotonisch medium.**

In de tweede groep bevruchtingsexperimenten betrof het eicellen die vooraf een parthenogenese inducerende stimulus toegediend hadden gekregen door voor – incubatie gedurende 1 uur en 15 minuten in 6/10 medium. In de controle bevruchtingsexperimenten werden de eicellen voor het toevoegen van de zaadcellen – suspensie 1 uur en 15 minuten in normaal medium geactiveerd

Tabel VII – I Resultaten van in vitro bevruchtingsexperimenten van haploïde en diploïde parthenogenonten. (aktivatie door incubatie in 4/5 medium gedurende 2 uur en 25 minuten en een korte hyaluronidasebehandeling.)

exp. nr. en type parth.	aantal geisol. eicellen	aantal parth. geakt.	aantal bruikbare chrom. prep.	aantal bevr. parth.	perc. bevr. parth.	contr. bevr. perc.
I – ha (*)	87	14	12	1	8%	55%
II – ha	74	41	35	3	9%	29%
III – ha	114	40	27	1	4%	47%
totaal ha	275	95	74	5	7%	44%
I – di(**)	87	6	5	0	0%	55%
II – di	74	11	11	0	0%	29%
III – di	114	7	4	0	0%	47%
totaal di	275	24	20	0	0%	44%

\* ha = haploïde parthenogenonten, type 2pb1pn

\*\* di = diploïde parthenogenonten, type 1pn of 2pn

Tabel VII – II. Aantallen en typen parthenogenetisch geactiveerde en/of bevruchte eicellen na pogingen tot in vitro bevruchting van eicellen die een parthenogenese inducerende voorincubatie gedurende 1 uur en 15 minuten in 6/10 medium hadden ondergaan.

geëxpl. ei – cellen	geact. en/of bevr. eicellen	type selectie na parth. aktivatie en/of bevruchting				contr. bevr. perc.
		2pb1pn	2pb2pn	2pn of 1pn	i.c.	
152	119 = (78%)	20 = 17%	9 = 8%	38 = 32%	52 = 44%	68%
272	223 = (82%)	49 = 22%	23 = 10%	46 = 21%	105 = 47%	56%
280	265 = (95%)	87 = 33%	28 = 11%	104 = 39%	46 = 17%	65%
totaal: 704	607 = (86%)	56 = 26%	60 = 10%	188 = 131%	203 = 33%	63%

Tabel VII—III. Cytogenetische analyses van in vitro bevruchtingsexperimenten van parthenogenetisch geactiveerde eicellen.

type parthe- nogenont of embryo	parthenogenonten zonder 2pb								2pb2pn en 2pb1pn
	onmiddelijk delend				diploïde 1pn of 2pn				
exp. nr.	IV	V	VI	totaal	IV	V	VI	totaal	VI (**)
aantal parth.	52	105(*)	46	203	38	46	104	188	115
aantal vervaardigde prep.	30	67	34	131	38	28	96	162	101
aantal bruikbare prep.	22	57	26	105	28	2	73	103	82
Resultaten preparaten analyses:									
40chr. + 1k of 20chr. + 2k	5	3	8	16	3	1	16	20	
40chr. + 2k of 20chr. + 3k	2	9	2	13	1	0	0	1	
40chr. + 3k of 20chr. + 4k	0	1	0	1	1	0	0	1	
60chr.	0	2	0	2	4	0	1	5	
totaal aantal/	7	15	10	32	9	1	17	27	
perc. gepene- treerde parth.	32%	26%	38%	30%	32%	50%	23%	26%	
2pb + 40chr. + 1k of 2pb + 20chr. + 2k									13
2pb + 40chr. + 2k of 2pb + 20chr. + 3k									3
2pb + 40chr. + 3k of 2pb + 20chr. + 4k									0
2pb + 60chr.									5
totaal aantal/									21
percentage gepenetreerde parth. of triploïde embryo's									26%

(Aktivatie gedurende 1 uur en 15 minuten in 6/10 medium.)

chr. = chromosomen; k = gezwollen spermakop. (Zie foto's 14—20)

(\*) Van 26 parthenogenonten werden geen chromosoompreparaten gemaakt. Zij werden verder gekweekt in normaal medium. Na 18 uur verdere kweek was één parthenogenont gedegeneerd en waren er 11 weer 1-cellig geworden. Van de overige waren er 6 gefragmenteerd, 7 tweecellig en 9 viercellig; respectievelijk 23%, 27% en 35%.

(\*\*) De geactiveerde eicellen uit experimenten IV en V van deze typen zijn niet verder onderzocht.



Hierdoor waren deze eicellen in dezelfde mate in vitro verouderd als de eicellen uit de experimentele groepen. Negen tot 9,5 uur na de toevoeging van de zaadcellen – suspensie werden de eicellen geselecteerd en werden de aantallen bevruchte eicellen (2pb2pn) geteld. Na een verdere incubatie in medium met colchicine werden chromosoompreparaten gemaakt. De resultaten van de analyses van deze preparaten staan in tabel VII – II en VII – III.

Wanneer we de controle bevruchtingspercentages vergelijken met het percentage verkregen 2pb2pn cellen (63% en 10%) dan blijkt uit dit grote verschil dat de voorincubatie in 6/10 medium een sterke invloed heeft op de eicellen. De groep 2pb2pn kan zowel uit normaal bevruchte, niet parthenogenetisch geactiveerde eicellen bestaan alsmede uit bevruchte aanvankelijk tot 2pb1pn geactiveerde parthenogenonten. Gelet op het percentage haploïde parthenogenonten type 2pb1pn na de pogingen tot bevruchting (26%) en het percentage parthenogenonten dat elders (zie tabel VI – VI) met dezelfde aktivatie methode werd verkregen (15%), is het onwaarschijnlijk dat er type 2pb2pn cellen aanvankelijk tot de groep van het haploïde parthenogenonttype 2pb1pn heeft behoord.

De overeenkomstige typen parthenogenonten en embryo's werden na deze selectie verder gekweekt in medium met colchicine waarna er chromosoompreparaten van werden gemaakt. De cytogenetische resultaten van deze experimenten staan vermeld in tabel VII – III.

De onderstaande foto's illustreren de verschillende waarnemingen aan de chromosoompreparaten uit tabel VII – III. Foto 14 toont een preparaat van een i.c. – parthenogenont: duidelijk zijn twee haploïde groepen chromosomen zichtbaar en twee gezwollen zaadcelkoppen. Foto 15 toont een chromosoompreparaat van een diploïde parthenogenont met 40 chromosomen. Boven de chromosomen bevinden zich twee gezwollen koppen van gepenetreerde zaadcellen. Eenzelfde dubbele bevruchting maar nu van een type 2pn parthenogenont wordt geïllustreerd op foto 16. De verschillende mate waarin de koppen van de gepenetreerde zaadcellen transformeren wordt in foto's 15 – 20 geïllustreerd. In foto 15 is de kop van de zaadcel duidelijk getransformeerd doch er heeft slechts een geringe zwelling plaats gevonden. Deze zwelling is op de foto's 16 en 17 reeds aanzienlijk verder voortgeschreden terwijl er op de foto's 18, 19 en 20 sprake is van een complete transformatie tot chromosomen. Foto 19 is een detailopname van foto 18. Deze foto's tonen een diploïde parthenogenont die bevrucht is door één zaadcel en derhalve 60 chromosomen bevat. Foto 20 is een soortgelijke illustratie doch hier werd een haploïde parthenogenont type 2pb1pn bevrucht. Dit preparaat bevat dus slechts 40 chromosomen en het beeld komt overeen met datgene wat we kunnen verwachten van een normaal bevruchte eicel.

Uit de resultaten in tabel VII – III blijkt dat er van de 32 bevruchte i.c. –

parthenogenonten 13 (41%) dubbel bevrucht werden (zie foto's 14, 15 en 16)) en één zelfs drie keer (3%). Hoogstwaarschijnlijk zijn de beide blastomeren van de i.c. – parthenogenonten beide een keer bevrucht hoewel polyspermie niet uitgesloten kan worden blijkens het ene geval van drievoudige bevruchting. Bij de diploïde parthenogenonten werd slechts in 2 van de 27 bevruchte parthenogenonten meervoudige bevruchting waargenomen (7%). Uit deze aantallen kan geconcludeerd worden dat er of sprake is van verschillen in aktivatie bij i.c. – parthenogenonten en diploïde parthenogenonten of, indien dat niet het geval is, de beide blastomeren van de i.c. – parthenogenonten bij 44% van de bevruchte parthenogenonten worden bevrucht. Uit deze dubbele bevruchting van de i.c. – parthenogenonten enerzijds en de slechts incidentele waargenomen polyspermie anderzijds blijkt dat de aktivatie van de i.c. – parthenogenonten door de zaadcel per blastomeer plaatsvindt, met andere woorden dat de polyspermieblokkade intracellulair is gelokaliseerd. Definitief bewijs hiervoor kan geleverd worden door de beide blastomeren apart te analyseren door de cellen na pronase – behandeling van elkaar te scheiden en van iedere cel een apart chromosoompreparaat te maken.

Uit de resultaten blijkt tevens dat de gepenetreerde zaadcellen slechts incidenteel een volledige transformatie tot duidelijk herkenbare chromosomen ondergaan. Er is meestal sprake van een duidelijk zwellen van de kop van de zaadcel met een meer of minder duidelijke chromosoomcondensatie. Het is mogelijk dat de onvolledige transformatie veroorzaakt wordt door een intracellulaire remming van die transformatie als gevolg van de parthenogenetische stimulatie. Mogelijk vindt door deze parthenogenetische stimulatie een incomplete eicel – aktivatie plaats die een penetratie door een zaadcel niet kan verhinderen maar de transformatie van een eenmaal gepenetreerde zaadcel als regel wel weet te voorkomen.

Ook hiervoor zou nader onderzoek gewenst zijn. Nagegaan zou moeten worden in hoeverre een zaadcelkop, welke een parthenogenont is binnengedrongen, door middel van transplantatie met een micromanipulator in een normaal bevruchte eicel waar de mannelijke pronucleus uit verwijderd is, wel tot volledige transformatie kan komen.

## VII – 4    Discussie

Zeer opvallend in de resultaten van de eerste serie experimenten (I – II) zoals die vermeld staan in tabel VII – I is het feit dat er geen enkele van de 20 diploïde parthenogenonten bevrucht was, terwijl 5 van de 74 haploïde parthenogenonten wel bevrucht waren (7%). Als criterium voor bevruchting bij de analyses van de chromosoompreparaten werd uitgegaan van een penetratie van een parthenogenont door een of meer zaadcellen. Dit kwam in de preparaten tot uiting door de

aanwezigheid van een meer of minder getransformeerde kop van een zaadcel of door 20 extra chromosomen, of een veelvoud van 20 ingeval meervoudige bevruchting heeft plaats gevonden. De verschillen in de bevruchtingspercentages bij de verschillende typen parthenogenonten zouden een aanwijzing kunnen zijn voor verschillen in de aktivatieprocessen bij die typen parthenogenonten. Het bevruchtingspercentage in de controlegroep (29%–55%) is lager dan gewoonlijk verkregen werd (70%–100%). Een reden hiervoor kan de hyaluronidasebehandeling zijn en de ouderdom van de eicellen. (Hammond, 1934; Braden, 1959; Yanagimachi & Chang, 1961; Adams & Chang, 1962.) Ten aanzien van de tweede serie experimenten (IV–V) blijkt het aktivatiepercentage in overeenstemming te zijn met de reeds eerder verkregen resultaten (respectievelijk 86% en 86%) terwijl ook de bevruchtingspercentages in de controle – experimenten hoger waren.

Een groot verschil met de eerste serie experimenten vormen de onderscheidenlijke percentages gepenetreerde diploïde parthenogenonten. In de eerste serie bleek geen enkele diploïde parthenogenont gepenetreerd te zijn (0%) terwijl er in de tweede serie niet minder dan 26% minimaal door één zaadcel was gepenetreerd. Dit duidt op een verschil in het aktivatieproces van de parthenogenonten in de beide series dat waarschijnlijk veroorzaakt wordt door de verschillen in de aktivatiemethode en resulteert in het al dan niet optreden van de corticale reactie. Niet alleen in de groep diploïde parthenogenonten, doch eveneens in de onmiddelijk delende en haploïde parthenogenonten werden ongeveer dezelfde percentages gepenetreerd, respectievelijk 30% en 26%. In de haploïde groep is echter mogelijk een gedeelte normaal bevrucht zodat dit percentage in werkelijkheid lager kan liggen. Dit lijkt aannemelijk omdat er zowel preparaten gevonden werden waarin het tweede poollichaampje met 20 chromosomen en een gezwollen zaadcelkop gevonden werd alsmede preparaten met het tweede poollichaampje en 40 chromosomen. Deze a – synchrone ontwikkeling tussen de vrouwelijke pronucleus en wat normaal gesproken later de mannelijke pronucleus zou worden, wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat het hier aanvankelijk tot haploïde parthenogenonten geactiveerde eicellen betreft, welke vervolgens alsnog gepenetreerd waren door een zaadcel. De hier waarschijnlijk gemaakte mogelijkheid om onmiddelijk delende parthenogenonten alsnog te kunnen bevruchten kan een verklaring zijn voor het feit dat er in de natuur soms dieren worden aangetroffen welke zowel mannelijke als vrouwelijke kenmerken en organen bezitten. Men spreekt dan van hermafrodieten of gynandromorfe dieren. Ook bij muizen zijn deze afwijkingen gevonden. Volwassen gynandromorfe muizen zijn onder andere door Danforth (1927), Fekete (1937), Klein (1955) en Hollander et al. (1956) beschreven. Een mogelijke verklaring voor deze afwijking zou het verlies van het geslachtschromosoom in een helft van het embryo kunnen zijn. Dit mechanisme is bekend bij *Drosophila* (Bridges, 1925). Een tweede mogelijke verklaring gaat uit van de veronderstelling dat dubbele bevruchting plaats vindt van een tweecellige eicel afkomstig van een oöcyt welke tijdens de eerste meiotische deling twee gelijke cellen heeft gevormd in plaats van de gebruikelijke ongelijke deling welke resulteert in de vorming van het eerste

poollichaampje. De tweecellige eicel zou dan respectievelijk door een X- en een Y-chromosoom bevattende zaadcel bevrucht zijn (Braden, 1957). Een soortgelijke verklaring wordt door Zwelzer en medewerkers (Zwelzer et al., 1964) gegeven. Zij werden geconfronteerd met een patient waarvan uit cytogenetisch onderzoek was gebleken dat hij een XX/XY-karyotype had. Zwelzer en medewerkers verklaarden het ontstaan van dit karyotype door een dubbele bevruchting te veronderstellen van zowel de eicel zelf alsme de het tweede poollichaampje. Bevruchting van het tweede poollichaampje is, zowel bij hogere als bij lagere diersoorten echter nooit waargenomen (Austin, 1956), zodat deze verklaring waarschijnlijk niet de juiste is. Door de hier aangetoonde mogelijkheid onmiddellijk delende parthenogenonten te bevruchten kan men nog een andere mogelijke verklaring geven voor het ontstaan van hermafrodieten. Het is bekend dat bij sommige dieren spontane parthenogenese optreedt in vivo (zie hoofdstuk II-6). Door nu een dubbele bevruchting te veronderstellen van een onmiddellijk delende parthenogenont door respectievelijk een X- en een Y-chromosoom bevattende zaadcel zou op eenvoudige wijze een hermafrodiet tot stand gebracht kunnen worden.

Reeds in 1912 onderzocht Bataillon het effect van parthenogenetische aktivatie op de verdere bevruchtingsmogelijkheden. Hij toonde bij de amfibieën aan dat de parthenogenetische aktivatie (afsnoering van het tweede poollichaampje) gepaard ging met een corticale reaktie, welke geheel te vergelijken was met die van de bevruchting. Dit werd tevens geïllustreerd door het feit dat de geaktiveerde eieren niet meer te bevruchten waren.

Chang (1952) onderzocht de invloed van een incubatie in vitro bij niet-fysiologische temperaturen op de mogelijkheid tot bevruchting na zo'n incubatie. Het is bekend dat dergelijke incubaties parthenogenese kunnen induceren bij zoogdiereicellen (hoofdstuk III.3). Chang nam waar dat een incubatieperiode van 24 uur optimaal was voor de inductie van parthenogenese bij konijn-eicellen. Na incubatie in 0 en 10 graden Celsius gedurende zo'n periode werd respectievelijk nog 40% en 75% normale bevruchting waargenomen, terwijl na zo'n zelfde incubatie bij respectievelijk 75% en 57% parthenogenetische aktivatie werd waargenomen. Op grond van deze getallen kan dus eigenlijk geconcludeerd worden dat bij konijn-eicellen bevruchting nog mogelijk is na parthenogenetische aktivatie door incubatie bij verlaagde temperaturen. In een eigen commentaar op deze experimenten geeft Chang (1953) later toe dat zijn criteria voor bevruchting niet juist waren "since the nuclear configuration and the chromosome number of ova parthenogenetically activated following low temperature storage was very similar to that of a normal fertilized ovum."

Austin en Braden (1954 - A) onderzochten eveneens in hoeverre parthenogenetisch geaktiveerde ratte-eicellen nog te bevruchten waren. Daartoe aktiveerden zij de eicellen in vivo door gedurende een minuut een stuk ijs tegen het oviduct te houden.

Na deze behandeling werd in de controlegroep bij 99% van de eicellen afsnoering van het tweede poollichaampje waargenomen. In de experimentele groep werd 40% van deze eicellen daarna door een of meer zaadcellen gepenetreerd, terwijl bij 18% normale mannelijke pronuclei" werden waargenomen. Geconcludeerd werd dan ook dat parthenogenetische aktivatie bij ratte – eicellen de polyspermieblokkade niet aktiveert en alsnog normale bevruchting en deling kan plaatsvinden. "Only the block to polyspermy appears to be a specific response to sperm penetration", aldus Austin en Braden.

Chalmel (1962) aktiveerde konijn – eicellen door een afkoeling tot 10 graden Celsius gedurende 24 uur. Door deze aktivatiemethode verkreeg zij 100% diploïde parthenogenetische ontwikkeling. Dertig minuten na het begin van de incubatie bij lage temperatuur migreerden de chromosomen naar het midden van de eicel waar zij na twee tot drie uur een diploïde pronucleus gevormd hadden. Van de aldus geactiveerde eicellen werd 29% in vitro bevrucht en 45% in vivo. In deze groep werd bij 7% polyspermy waargenomen. Dit percentage is beduidend hoger dan de 1,4% die bij normale bevruchting wordt waargenomen. Ook werden zeer verschillende transformatiepatronen bij de gepenetreerde zaadcellen waargenomen.

Fléchon en medewerkers (Fléchon et al., 1975) onderzochten de dynamiek van corticale granulae bij konijn – eieren. Met behulp van de elektronenmicroscop werd vastgesteld dat corticale granulae gedurende de gehele periode waarin de eicellen bevrucht kunnen worden (8 – 10 uur na de ovulatie) aanwezig blijven. Ook na parthenogenetische stimulatie (24 uur afkoeling tot 10 graden Celsius), waren de corticale granulae nog aanwezig. Deze geactiveerde eicellen bleven bevruchtbaar. In bevruchte eicellen en in geactiveerde eicellen welke vervolgens bevrucht waren, waren de corticale granulae verdwenen: *c'est la pénétration du spermatozoïde fécondant qui provoque l'émission des GC et en retour, cette réaction corticale inhibe la fusion avec l'oeuf de spermatozoïdes surnuméraires*".

Tijdens de oocytrijping gedurende de meiose verkrijgt het cytoplasma in toenemende mate de mogelijkheid de kernen van zaadcellen te decondenseren en in functionele pronucleï te transformeren. Er zijn kennelijk bepaalde cytoplasmatische veranderingen nodig om een kern van een zaadcel om te kunnen zetten in een mannelijke pronucleus. Dit is aangetoond bij de muis (Iwamatsu & Chang, 1972; Balakier & Tarkowski, 1980) alsmede bij de rat (Niwa & Chang, 1975) en de hamster (Barros & Munoz, 1973; Usui & Yanagimachi, 1976)

Komar (1982) onderzocht in hoeverre de parthenogenetisch geactiveerde eicel de mogelijkheid heeft verkregen om de kern van de zaadcelkop te decondenseren en hoelang na de aktivatie deze mogelijkheid behouden blijft. Tevens onderzocht hij of deze kern tot mannelijke pronucleus getransformeerd kon worden en of de pronucleus deelneemt aan de eerste klievingsdeling. Komar activeerde de eicellen door incubatie bij 44,5 graden Celsius gedurende 5 minuten. De resultaten bij muize – eicellen toonden aan dat de decondensatiefactor tenminste tot anderhalf

uur na de aktivatie in geaktiveerde eicellen aanwezig blijft en zaadcelkernen in verschillende mate decondenseren. Deze gedeeltelijke transformatie van de zaadcelkern in geaktiveerde muize – eicellen en het geheel ontbreken van zo'n transformatie in geaktiveerde ratte – en konijne – eicellen kunnen volgens Komar wijzen op verschillende, soortspecifieke, reacties op bepaalde aktivatiemethoden.

Op grond van de bovenvermelde en de eigen, hier beschreven resultaten, lijkt het zeer waarschijnlijk dat het al dan niet optreden van de corticale reactie na parthenogenetische aktivatie onder andere afhankelijk is van de aktivatiemethode welke wordt toegepast. Deze conclusie wordt bevestigd door elektronenmicroscopisch onderzoek aan muize – eicellen. Na een cytochalasine – B behandeling werd geen corticale reactie waargenomen (Wasserman et al., 1977) evenals na een gecombineerde hyaluronidasebehandeling met een incubatie in hypotoon medium (Solter et al., 1974). Na een incubatie in calciumvrij medium werd daarentegen wel een corticale reactie waargenomen (Whittingham & Siracussa, 1978) terwijl deze reactie waarschijnlijk eveneens optreedt in spontane teratomen (Eppig, 1978). Tenslotte bleek de reactie slechts gedeeltelijk op te treden na het toedienen van een lokale elektrische schok (Gulyas, 1976). Ook is de reactie op eenzelfde methode die bij verschillende diersoorten wordt toegepast niet gelijk (Gulyas, 1976).

Tenslotte is uit het hier beschreven werk gebleken dat het al dan niet optreden van de corticale reactie bij geaktiveerde eicellen van een bepaalde soort afhankelijk is van de gebruikte stimulatiemethode. Tevens is gebleken dat de verschillende typen parthenogenonten (van eenzelfde diersoort en verkregen met dezelfde aktivatiemethode) op verschillende wijze de corticale reactie ondergaan en derhalve tot verschillende resultaten leiden bij pogingen tot in vitro bevruchting.

## VII – 5 Conclusies

Uit de resultaten van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten om parthenogenetisch geaktiveerde eicellen te bevruchten kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- 1) de methode waarmee eicellen worden geaktiveerd is van invloed op de aktivatie van het mechanisme van de polyspermie – blokkade. Zo is het bijvoorbeeld mogelijk dat diploïde parthenogenonten die volgens een bepaalde manier geaktiveerd zijn niet meer bevrucht kunnen worden (VII – 3.1) terwijl hetzelfde diploïde type parthenogenont dat op een andere wijze geaktiveerd is, nog wel bevrucht kan worden (VII – 3.2).
- 2) de typen parthenogenonten die met eenzelfde methode geaktiveerd zijn

reageren verschillend ten aanzien van de bevruchtingsmogelijkheid. Zo zijn haploïde parthenogenonten na een bepaalde aktivatie – methode nog te bevruchten terwijl de diploïde parthenogenonten die op dezelfde wijze zijn geactiveerd niet meer bevrucht kunnen worden (VII – 3.1)

3) de effectiviteit van de aktivatie van de polyspermie – blokkade door de parthenogenese inducerende behandeling en daarna tevens door een gepenetreerde zaadcel is sterk afhankelijk van het type parthenogenont dat geïnduceerd is. Gebleken is dat 44% van de i.c. – parthenogenonten door meer dan één zaadcel werd gepenetreerd terwijl dit bij de diploïde parthenogenonten bij slechts 7% het geval was.

4) hoewel parthenogenetisch geactiveerde eicellen nog bevrucht kunnen worden vindt er slechts zelden een volledige transformatie van de kop van de zaadcel in metafase – chromosomen plaats. Er treedt wel een meer of minder duidelijk zwellen van de zaadcel op.

## HOOFDSTUK VIII

### ONTWIKKELINGSSNELHEID EN ENIGE MORFOLOGISCHE ASPEKTEN VAN VROEGE PARTHENOGENETISCHE EN EMBRYONALE STADIA BEPAALD MET BEHULP VAN VERTRAAGDE MICROSCOPISCHE FILMOPNAMEN

#### VIII – 1 Inleiding

In hoeverre de beperkte ontwikkelingsmogelijkheden van parthenogenonten ten opzichte van die van embryo's reeds in de vroege ontwikkelingsstadia waarneembaar zijn is onder andere na te gaan door een vergelijkende studie tussen beide groepen te verrichten, bijvoorbeeld naar de delingssnelheden van de cellen en enige morfologische aspecten van die delingen. Voor zo'n studie zijn vertraagde, microscopische filmopnamen bij uitstek geschikt. Op deze wijze kan men immers de microscopische waarnemingen "eindeloos" herhalen en iedere opname stuk voor stuk bestuderen. Bovendien is het mogelijk objectieve, dagenlang continue waarnemingen te verrichten waarbij men tevens ontwikkelingsdetails vastlegt welke men met een andere wijze van waarnemen niet opmerkt.

In dit hoofdstuk worden de resultaten besproken van zo'n vergelijkende studie. De verdere ontwikkeling van drie typen parthenogenonten werden daartoe vergeleken met de ontwikkeling van in vitro en in vivo bevruchte eicellen. In het verleden is de vertraagde filmtechniek reeds door een aantal onderzoekers toegepast in ontwikkelingsstudies.

In 1928 filmde Canti de groei van cellen in weefselkweek met het doel de effecten te bestuderen van straling op verschillende celtypen van normaal – en tumorweefsel. Er werd onder andere waargenomen dat de cellen zich na straling niet meer deelden en de amoëboïde bewegingen van fibroblasten ophielden.

Een jaar later worden door Rosenberger (1929) de technische aspecten van een microcinematografisch apparaat beschreven en publiceren Lewis en Gregory (Lewis & Gregory, 1929) de resultaten van filmopnamen (1 beeld per 24 seconden) van de ontwikkeling van ééncellige konijne – embryo's welke ongeveer 22 uur na de bevruchting uit de eileiders geïsoleerd waren. De opnamen vertoonden een bepaalde mate van celrotatie, vooral na iedere celdeling. Ook werd de blastocystvorming van twee embryo's gefilmd. Deze waren respectievelijk 67 en 71 uur na de bevruchting geïsoleerd. Zij vertoonden het inkrimpen van de blastocysten en het vervolgens weer uitzetten tot het oorspronkelijke volume. Gregory (1930) beschreef eveneens bij delende konijne – embryo's de onregelmatige bewegingen van de celmembranen tijdens en kort na de celdelingen.

Samen met Hartman filmde Lewis later ook celdelingen van een makaak – embryo (Lewis & Hartman, 1931) Ook Frommolt (1934) filmde (1 opname per 15 seconden) klievingsdelingen van konijne – embryo's. Bovendien werden opnamen van in vitro bevruchtingen gemaakt. Het juiste moment van bevruchting is met "erschütternder



Deutlichkeit" zichtbaar; binnen enige seconden ("fast blitzartig") krimpt de eicel ineen tot een gerimpelde cel welke daarna geleidelijk weer over gaat in een glad oppervlak. Voor de eerste deling neemt de bevruchte eicel een ovale vorm aan, 30 minuten hierna, dat wil zeggen 15 uur na de follikelsprong, is de deling voltooid.

Ook werd de ontwikkeling van zes – cellige embryo's tot het 32 – cellig stadium gefilmd. Bij deze morula – vorming werden de embryo's 30 uur na copulatie geïsoleerd.

Een volgende serie experimenten met filmopnamen werd door Kuhl en medewerkers verricht. (Kuhl & Friedrich – Freksa, 1936 en 1937; Kuhl, 1939 en 1941). Zij filmde (1 opname per 28 seconden) de verdere ontwikkeling van muize – embryo's die in verschillende stadia geïsoleerd waren waardoor geen aaneensluitende filmbeelden verkregen werden doch diverse korte stukjes film van steeds andere, in vivo ontwikkelde, embryo's.

Tevens werd in deze serie experimenten (Kuhl & Friedrich – Freksa, 1936) voor het eerst een parthenogenetische ontwikkeling gefilmd. Geconcludeerd werd namelijk dat de explantatieprikkel, ook bij onbevruchte eicellen, drie tot vijf uur later de vorming van het tweede poollichaampje tot gevolg heeft. In een geval werd een aansluitende deling waargenomen.

Moricard (1954) filmde de aanwezigheid van actief bewegende zaadcellen in de perivitelline ruimte van konijne – eicellen. Deze waarneming werd als test voorgesteld voor het eerste stadium van de bevruchting. Later werd deze filmtechniek ook door Blandau & Rumery gebruikt bij de bestudering van cavia – blastocysten.

Amoroso beschreef met behulp van deze film de vorming van een meerlagige "aanhechtingskegel" aan de tegenover de blastoderm liggende pool van de blastocyst, (Amoroso, 1959).

Cole bestudeerde muize – blastocysten. Hij nam eveneens snelle contracties waar die gevolgd werden door langzamere perioden van volumetoename tot de oorspronkelijke afmeting. Ook werd het buiten de zona pellucida treden van de blastocyst bestudeerd, waarbij gesteld werd dat dit het resultaat is van specifieke cellulaire activiteit.

Eveneens met deze filmtechniek werden door Blandau en medewerkers de amoëboïde bewegingen van primordiale geslachtsellen van muize – embryo's aangetoond (Blandau, White & Rumery, 1963).

Later werden ook door Cassini en Borghese (Cassini, 1962; Borghese & Cassini, 1963) time – lapse films gemaakt van de vroege embryonale ontwikkelingen van de muis vanaf het tweecellig stadium. Ook deze films zijn echter opgebouwd uit een montage van meerdere verschillende opnamen welke van diverse embryo's waren gemaakt. Zij tonen derhalve slechts bepaalde gedeelten van de vroege ontwikkeling en geen continu verloop van zygoten tot en met het blastocyststadium. De reden hiervoor was dat er nog geen medium beschikbaar was waarin een dergelijke aaneengesloten ontwikkeling in vitro kon plaatsvinden.

Sinds de eerste succesvolle in vitro ontwikkeling vanaf het achtcellig stadium tot aan het blastocyststadium (Hammond, 1949) zijn met name door het werk van Whitten (Whitten, 1956 en 1957) en Brinster (Brinster, 1963, 1964, 1965 – A,B,C,D) de mogelijkheden ten aanzien van de in vitro groei aanzienlijk verbeterd. Hierdoor werd het voor Mulnard (Mulnard, 1967) mogelijk om een continue ontwikkeling te filmen vanaf het tweecellig stadium tot aan het blastocyststadium. Ook Leonov en medewerkers (Leonov et al., 1972) filmde deze zelfde ontwikkelingsperiode. Zij bestudeerden met name het ontstaan van de derde celpopulatie, de ontwikkeling dus van het viercellig stadium tot aan het achtcellig stadium. In al deze studies ging men echter uit van het tweecellig stadium. Men was hiertoe gedwongen omdat men er nog steeds niet in geslaagd was na de eerste klievingsdeling (in vitro) een voortgezette embryonale ontwikkeling van muize-embryo's in vitro te laten plaatsvinden. Wel was Brachet er in 1970 al in geslaagd de in vitro bevruchting en eerste klievingsdeling te filmen, (16 beelden per minuut), van konijn-embryo's. Bij muize-embryo's was dat echter nog steeds niet gelukt.

Zeer recent is door Goddard & Pratt (1983) een analyse gepubliceerd over deze zogenaamde tweecelblokkade (the 2-cell block).

Pas nadat men dit probleem overwonnen had, (door een verbeterd medium samen te stellen en door met eicellen te werken welke van bastaardmuizen afkomstig waren), werd het mogelijk de ontwikkeling vanaf de zygote tot aan het blastocyst-stadium onafgebroken in vitro te volgen. De eerste klievingsdeling van in vivo bevruchte muize-eicellen werd in 1973 door Kaufman gefilmd (Kaufman, 1973 – B) evenals die van door hyaluronidase geactiveerde haploïde parthenogenonten (Kaufman, 1973 – C).

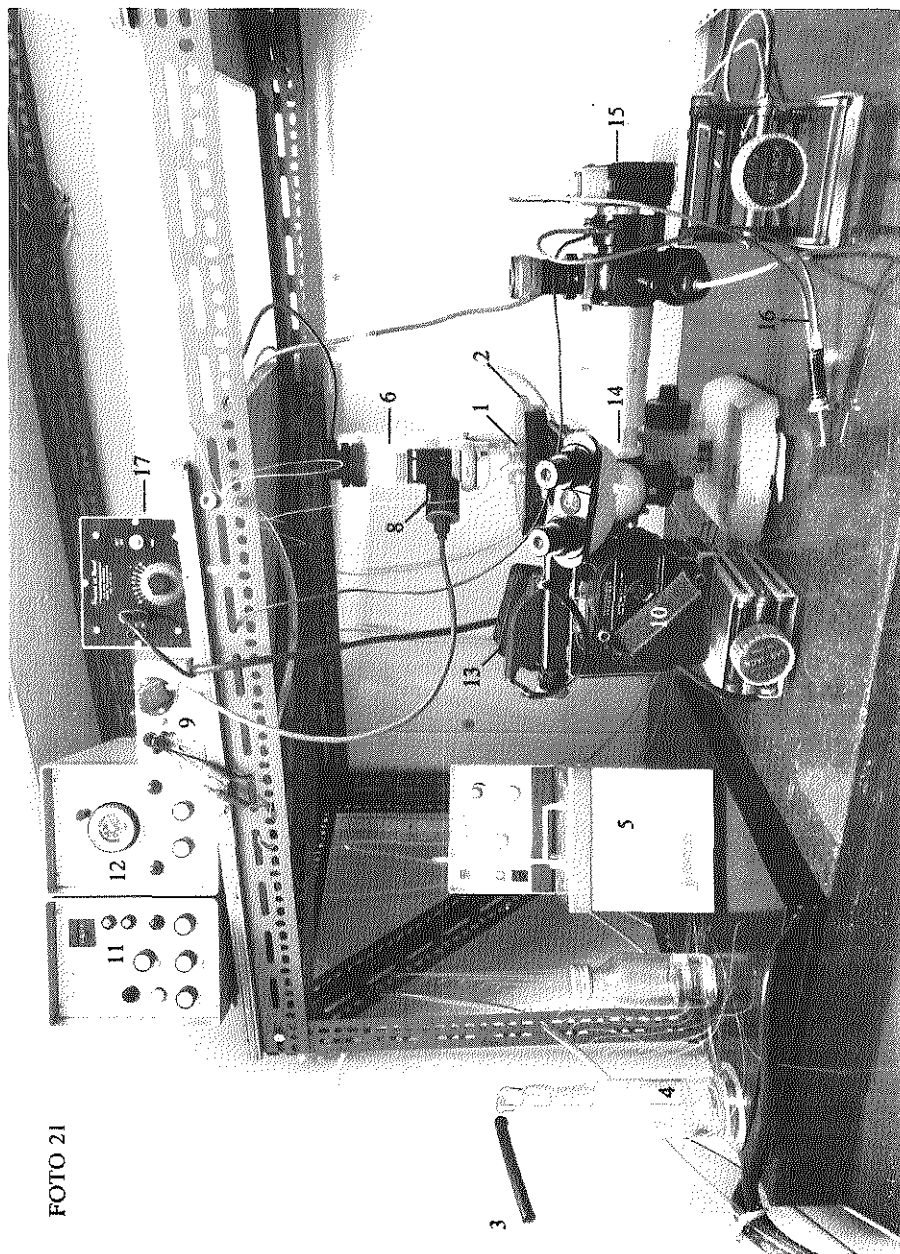
Voor details over en filmopnamen van in vitro rijping van muize-oöcyten wordt verwezen naar het werk van Sorensen (Sorensen, 1973) waarin speciale aandacht werd besteed aan de afbraak van het kiemblaasje, de vorming van de perivitelline ruimte, de metafase I vorming en de afsnoering van het eerste poollichaampje.

Ook Zeilmaker et al. (1974) filmde de in vitro rijping van muize-oöcyten. Een jaar eerder was ook reeds het ontstaan van chimaere rat-muis blastocysten gefilmd (Zeilmaker, 1973).

Lopata et al. (1977) bestudeerden de afbraak van het kiemblaasje en andere cytoplasmatische veranderingen van ratte-oöcyten die in vitro aan LH werden bloot gesteld. Eveneens met behulp van filmopnamen werden door Sato & Blandau (1979) de tweede meiotische deling en de vorming van het poollichaampje in muize-eicellen bestudeerd. Ook het binnendringen van de zaadcel werd bij muize-eicellen met behulp van time-lapse cinematografie geanalyseerd. Dit geschiedde zowel bij eicellen zonder omringende cumuluscellen (Sato & Blandau, 1979) alsmede bij eicellen die bovendien nog van hun zona-pellucida waren ontdaan (Wolf & Armstrong, 1978).

Het hierna beschreven werk is het eerste systematisch vergelijkende ontwikkelingsonderzoek bij muize-eicellen met behulp van time-lapse

FOTO 21



filmopnamen tussen in vivo en in vitro bevruchte eicellen en drie verschillende typen parthenogenonten vanaf het pronucleussadium tot aan, in sommige gevallen, het buiten de zona pellucida treden van de blastocyst.

Het doel van deze studie is, zoals reeds in het begin van de inleiding werd vermeld, na te gaan in hoeverre er een verband bestaat tussen mogelijke verschillen in ontwikkelingssnelheid in de beginfase van de embryonale ontwikkeling van de verschillende typen parthenogenonten en in vitro bevruchte embryo's ten opzichte van de ontwikkelingssnelheid van in vivo bevruchte embryo's en de verschillen in vitaliteit, gemeten aan de hand van het bereikte eindstadium, van deze groepen.

## VIII-2 Materialen en methoden

### VIII-2.1 Proefopstelling

De proefopstelling is weergegeven op foto 21. De gehele opstelling bevond zich in een klimaatkamer met een constante temperatuur van 34 graden Celsius. Het kweekbakje (1) met de te filmen objecten werd op de verwarmde mikroskooptafel (2) geplaatst en voorzien van continuë gastoevoer (3). Door het gas vooraf door gedestilleerd water te leiden werd een constante vochtigheidsgraad bereikt alsmede een constante gasfase. De mikroskooptafel (2) werd verwarmd met circulerend water van exact 37,4 graden C. afkomstig van een elektronisch gethermostreerd rondpomp waterbad (5) Julabo Paratherm U-5). Onder deze omstandigheden had het medium een nagenoeg constante temperatuur van 37,0 graden C. Deze strikte temperatuurregeling is van groot belang gezien de temperatuurafhankelijkheid van de klievingsdelingen (Kaufman, 1973b). In het verlichtingsgedeelte (6) van de mikroskoop, (7), (standaard UPI-Zeiss omkeermikroskoop) werd een elektronische flitser (8) aangebracht welke aangesloten was op een voedingsapparaat, (9), (Zeiss Ukatron UN-60). Dit voedingsapparaat ontvangt de ontladingsimpuls van de time-lapse apparatuur gelijktijdig met de opnamen van de filmbeeldjes.

Als time-lapse apparatuur werd een Paillard - Wild Variotimer gebruikt, welke uit drie elementen was opgebouwd: de "Motor MBF-A", (10), een "control unit MBF-B", (11), en een "timer MBE-C", (12). Het geheel was aangesloten op een Bolex-filmcamera (type H16 Reflex), (13), en de reeds eerder genoemde flitsapparatuur. De intervallen tussen de opnamen van de filmbeeldjes waren met behulp van de timer automatisch te regelen en instelbaar van 0,3 sec. tot 6 uur. Handbediening was eveneens mogelijk doch hiervan werd geen gebruik gemaakt. Met behulp van een draaibaar prisma in de mikroskooptubus (14) was het mogelijk foto's te maken met een eveneens aan de mikroskoop aangesloten fotocamera, (15). In dit geval werd de ontladingsimpuls voor de flitser gegeven door van een tweedradige draadontspanner welke tegelijkertijd de flitser en de sluiters van de camera bediende. Voor een uitgebreide beschrijving van deze methode en de verschillende technische aspecten ervan wordt verwezen naar de monografieën van Riddle (1979): "time-lapse cinemicroscopy" en van Rose (1963): "Cinematography in Cell Biology".

## VIII – 2.2 Filmanalyses

De film werden geanalyseerd op een filmmontagetafel. Aan het afdraaimechanisme zat een secondenteller gekoppeld welke bij het begin van de film op nul gesteld kon worden en vervolgens de tijd aangaf welke verstreken was vanaf het begin van de filmprojectie. De film werd met een snelheid van 25 beeldjes per seconde vertoond, zodat van ieder filmbeeld het corresponderende oorspronkelijke opname – moment bepaald kon worden. De stand van de secondeteller werd geschat in tienden van secondes. Een deling werd als voltooid beschouwd wanneer de twee uit een cel ontstane blastomeren duidelijk als zodanig te onderscheiden waren. Als begintijd voor de berekening van de delingstijdstippen werd bij de parthenogenonten het moment gekozen waarop de inductie van parthenogenese begon; bij in vitro bevruchte eicellen het moment waarop de zaadcellen bij de eicellen gevoegd werden en bij de in vivo bevruchte eicellen het geschatte tijdstip van ovulatie. Dit tijdstip werd onder de gebruikte conditie in de dierenverblijven op 05.00 uur (Zie IV – 2.4) bepaald en is tevens het moment waarop de eicellen met de zaadcellen in contact komen. Tenslotte werd een correctiefactor berekend voor de afwijkingen tussen de berekende en werkelijke tijd. Deze afwijkingen waren een gevolg van het ontbreken van een "fijn – instelling" van de timer van de time – lapse apparatuur. De tijd welke de secondenteller op de montagetafel aangaf bij het laatste filmbeeld werd vermenigvuldigd met 25 (25 beeldjes per seconde) en met de ingestelde intervalltijd van de timer. Deze berekende tijd werd vergeleken met de werkelijke tijdsduur welke verstreken was tussen het begin en het einde van de filmopnamen. Het verschil van deze "totaaltijden" bedroeg in geen enkel geval meer dan 5% van de werkelijke filmtijd.

De berekeningswijze is in formule weergegeven

## VIII – 3 Resultaten

De foto's 22 t/m 36 zijn samengestelde opnamen afkomstig van de zeer kleine negatieven van de films. Hoewel de kwaliteit daardoor sterk beïnvloed wordt zijn er in de verschillende series toch nog interessante details waar te nemen zoals bijvoorbeeld het oplossen van de pronuclei en het ontstaan en vervagen van kernen. De bij de foto's geplaatste tijden geven het moment van de opname aan gerekend vanaf het moment waarop de eicellen in contact kwamen met de zaadcellen of het moment waarop de parthenogenese inducerende incubatie begon.

De eerste serie beelden (foto 22) is een weergave van de eerste klievingsdeling van in vivo bevruchte eicellen. Goed geïllustreerd wordt de grote mate van synchroniteit die bestaat tussen de tijdstippen waarop de cellen delen.

In de tweede serie (foto's 23, 24 en 25) zijn wat meer cytoplasmatische details zichtbaar terwijl bovendien diverse overgangsstadia tussen het één – en het

### In formule weergegeven

$$T_{(x)} = T_o + T_{mt(x)} \times 25 \times T_{timer} + CF_{(x)}$$

$$CF_{(x)} = \frac{T_{mt(einde)} - T_{mt(start)} \times 25 \times T_{timer} - t_{film} \times T_{mt(x)} \times 25 \times T_{timer}}{T_{film}}$$

$T_{(x)}$  = tijdstip van een bepaald ontwikkelingsstadium zoals aangegeven op filmbeeldje X.

$T_o$  = periode tussen het begin van de ontwikkeling en de start van de filmopname.

$T_{mt(x)}$  = stand van de sekondeteller van de montagetafel bij filmbeeldje X tijdens de filmanalyse.

$T_{timer}$  = ingestelde intervaltijd van de time-lapse apparatuur.

$CF_{(x)}$  = correctiefactor voor filmbeeldje X.

$T_{mt(einde)}$  = stand van de sekondeteller van de montagetafel bij het laatste beeldje van de film.

$T_{mt(start)}$  = idem, bij het eerste beeldje.

$t_{film}$  = werkelijke tijdsduur van de filmopname.

tweecellig stadium zijn vastgelegd. Met name deze overgangsstadia zijn sterk afwijkend en duidelijk geïllustreerd in de derde en vierde serie (foto 26 en 27 – 28). Dit zijn opnamen uit films van haploïde parthenogenonten type 2pb1pn. Zeer duidelijk zijn de membraancontracties waarneembaar die optreden tijdens de eerste klievingsdeling. Op foto 26 blijkt dat de celmembranen zich weer ontspannen en de parthenogenonten de normale tweecel – configuratie aannemen.

Een geheel ander beeld treffen we in de volgende serie aan, foto's 29 – 31. Het betreft hier eveneens haploïde parthenogenonten doch nu van het type i.c. Bij de eerste klievingsdeling van dit type parthenogenont worden geen membraancontracties waargenomen. Ook bij de tweede en derde klievingsdelingen die in deze serie eveneens geïllustreerd worden is deze contractie niet te zien. Hoewel de ligging van de parthenogenonten op de foto's 29, 30 en 31 sterk verschilt zijn het toch dezelfde objecten. Op foto 30 zijn de nog niet gedeelde parthenogenonten tijdens de filmopnamen uit het mikroskoopbeeld van foto 29 verwijderd en de tweecelligen in

$$G-I = \frac{1}{p} \frac{X_p(2c)}{p}$$

$$G-II = \frac{1}{q} \frac{X_q(3c) + X_q(4c)}{2} - X_q(2c)$$

$$G-III = \frac{1}{r} \frac{X_r(5c) + X_r(6c) + X_r(7c) + X_r(8c)}{4} - \frac{X_r(3c) + X_r(4c)}{2}$$

p, q en r : het aantal parthenogenonten of embryo's, dat respectievelijk het twee-, vier- en acht-cellig stadium heeft bereikt.

$X_p(2c)$  : het tijdstip X (in uren), waarop één van de 'p' embryo's of parthenogenonten het twee-cellig stadium bereikt.

Tabel VIII-I. Gemiddelde tijdsduur in uren en decimalen met standaarddeviatie benodigd voor de vorming van bepaalde ontwikkelingsstadia van parthenogenonten of embryo's.

Aantal gevormde cellen	Haploïde parth. type 2pb1pn	Diploïde parth. type 1pn of 2pn	Haploïde parth. type i.c.	In vitro bevruchte embryo's	In vivo bevruchte embryo's
2	28,48 ± 8,27 (n = 10)	20,41 ± 2,78 (n = 12)	2,96 ± 0,98 (n = 18)	22,61 ± 0,45 (n = 7)	15,49 ± 0,73 (n = 35)
3	53,51 ± 3,51 (n = 4)	54,67 ± 10,41 (n = 11)	19,08 ± 1,88 (n = 17)	52,10 ± 6,23 (n = 7)	38,86 ± 3,40 (n = 32)
4	60,12 ± 9,95 (n = 4)	58,38 ± 7,10 (n = 10)	20,40 ± 2,34 (n = 16)	54,18 ± 7,01 (n = 7)	40,23 ± 3,90 (n = 30)
5		70,56 ± 8,37 (n = 10)	49,71 ± 4,48 (n = 14)	66,28 ± 7,88 (n = 6)	54,39 ± 5,73 (n = 27)
6		72,38 ± 9,77 (n = 10)	52,69 ± 6,50 (n = 13)	68,44 ± 7,70 (n = 6)	55,58 ± 6,56 (n = 25)
7		73,91 ± 10,24 (n = 10)	56,90 ± 8,49 (n = 12)	70,48 ± 7,96 (n = 6)	54,31 ± 4,69 (n = 22)
8		80,18 ± 12,54 (n = 10)	60,66 ± 7,64 (n = 12)	73,53 ± 7,67 (n = 6)	55,87 ± 5,73 (n = 21)



9	79,07 ± 8,44 (n = 7)	66,89 ± 7,12 (n = 11)	77,13 ± 6,17 (n = 5)	(*)
10	81,57 ± 6,13 (n = 7)	67,33 ± 5,98 (n = 9)	79,24 ± 5,67 (n = 5)	
11	83,10 ± 7,87 (n = 7)	71,06 ± 8,43 (n = 9)	82,30 ± 4,60 (n = 5)	
12	83,63 ± 8,01 (n = 7)	71,56 ± 8,35 (n = 8)	83,56 ± 4,96 (n = 5)	
13	84,44 ± 8,11 (n = 7)	72,28 ± 7,98 (n = 7)	84,41 ± 5,75 (n = 4)	
14	85,10 ± 8,49 (n = 7)	73,72 ± 8,90 (n = 7)	87,60 ± 8,06 (n = 3)	
15	85,91 ± 9,46 (n = 6)	76,14 ± 9,75 (n = 6)	85,76 ± 5,18 (n = 2)	
16	83,42 ± 6,81 (n = 5)	80,32 ± 10,47 (n = 6)	86,53 ± 5,44 (n = 2)	
B	104,72 ± 17,39 (n = 2)		99,45 (n = 1)	

(\*) De verdere delingsstijdstippen waren niet meer vast te stellen i. v. m. het "vervloeien" van de celgrenzen als gevolg van het aannemen van de morula configuratie.

B: Blastocyst.

Tabel VIII-II. Gemiddelde tijd waarin de verschillende typen parthenogenonten en embryo's, ongeacht het bereikte eindstadium, respectievelijk het twee-, vier- en achtcel- lig stadium bereiken.

Type Parthenogenont of embryo	tweecellig ± s.d.	viercellig ± s.d.	achtcellig ± s.d.
Haploïde parthenogenonten type 2pb1pn	28h29' ± 8h16' (n = 10)	60h07' ± 9h57' (n = 4)	—
Diploïde parthenogenonten type 2pn of 1pn	20h25' ± 2h47' (n = 12)	58h23' ± 7h06' (n = 10)	80h11' ± 12h33' (n = 10)
Haploïde parthenogenonten type i.c.	2h58' ± 0h59' (n = 18)	20h24' ± 2h21' (n = 16)	60h40' ± 7h39' (n = 12)
In vitro bevruchte embryo's	22h36' ± 0h27' (n = 7)	54h11' ± 7h00' (n = 7)	73h32' ± 7h40' (n = 6)
In vivo bevruchte embryo's	15h30' ± 0h49' (n = 35)	40h14' ± 3h54' (n = 30)	55h52' ± 5h44' (n = 21)

(Deze tijden zijn dezelfde als vermeld in tabel VIII-I, doch nu slechts voor drie stadia en uitgedrukt in uren (h) en minuten (').

Tabel VIII-III. Gemiddelde celcyclustijden in uren (h) en minuten (') van de eerste-, tweede- en derde celgeneratie van verschillende typen parthenogenonten en embryo's.

Type parthenogenont of embryo	Eerste Celgeneratie	Tweede Celgeneratie	Derde Celgeneratie
2pb1pn	28h29' ± 8h16' (n = 10)	31h24' ± 8h10'	—
2pn of 1pn	20h25' ± 2h47' (n = 12)	35h55' ± 9h31' (n = 10)	17h59' ± 4h19' (n = 10)
i.c.	2h58' ± 0h59' (n = 18)	16h29' ± 1h42' (n = 16)	34h54' ± 4h47' (n = 12)
in vitro bevruchte embryo's	22h36' ± 0h27' (n = 7)	30h33' ± 8h55' (n = 7)	18h00' ± 6h40' (n = 6)
in vivo bevruchte embryo's	15h30' ± 0h49' (n = 35)	23h58' ± 3h44' (n = 30)	15h27' ± 3h28' (n = 21)

Tabel VIII-IV. Verschillen in ontwikkelingssnelheid tussen groepen parthenogenonten of embryo's van hetzelfde type die echter groepsgewijs verschillende eindstadia hebben bereikt.

type parthenogenont of embryo	geanalyseerd stadium	vergeleken eindstadia	vergeleken gemiddelde ontwikkelingstijden	N.S.D./S.D.
in vivo bevruchte embryo's	2-cellig	8c (13) en 8c (22)	15,54 en 15,46	N.S.D.
	2-cellig	8c-M (13) en B ( 8)	15,70 en 15,13	N.S.D.
	4-cellig	4c-8c ( 8) en M (21)	43,47 en 38,95	S.D.
	4-cellig	4c-8c ( 8) en B ( 8)	43,47 en 39,88	S.D.
	8-cellig	8c-M (13) en B ( 8)	55,51 en 55,47	N.S.D.
2pb1pn	2-cellig	4c ( 6) en 4c ( 4)	32,25 en 17,82	S.D.
2pn of 1pn	2-cellig	8c ( 5) en 16c ( 5)	19,33 en 21,92	N.S.D.
	4-cellig	16c ( 5) en 16c ( 5)	63,62 en 53,15	S.D.
	4-cellig	8c-M ( 8) en B ( 2)	84,41 en 63,27	S.D.
	8-cellig	M ( 3) en B ( 2)	77,20 en 63,27	S.D.
	8-cellig	8-16c ( 5) en M ( 5)	88,73 en 71,63	S.D.
i.c.	2-cellig	8c ( 7) en 8c (11)	2,80 en 3,05	N.S.D.
	4-cellig	4-13c ( 9) en 16c ( 7)	21,42 en 19,06	S.D.
	8-cellig	8-13c ( 5) en 16c ( 7)	65,22 en 56,11	S.D.

Tabel VIII-V. Verschillen in ontwikkelingssnelheid tussen groepen parthenogenonten en in vitro bevruchte embryo's ten opzichte van in vivo bevruchte embryo's, die echter groepsgewijs wel eenzelfde eindstadium bereikt hebben.

Geanalyseerd stadium	Behaald eindstadium	Vergeleken typen en aantallen		Vergeleken gemiddelde ontwikkelingstijden	N.S.D./S.D.
2-cellig	4-cellig	ha	( 4) en vivo (30)	22,82 en 15,48	S.D.
2-cellig	8-cellig	di	(10) en vivo (22)	20,32 en 15,47	S.D.
4-cellig	8-cellig	di	( 9) en vivo (21)	58,38 en 39,05	S.D.
8-cellig	M	di	( 5) en vivo (21)	71,63 en 55,50	S.D.
2-cellig	4-cellig	i.c.	(16) en vivo (30)	2,99 en 15,48	S.D.
4-cellig	8-cellig	i.c.	(11) en vivo (21)	19,55 en 39,05	S.D.
4-cellig	16-cellig	i.c.	( 7) en vivo (21)	19,05 en 38,95	S.D.
2-cellig	8-cellig	i.c.	(11) en vivo (22)	3,05 en 15,47	S.D.
2-cellig	16-cellig	i.c.	( 7) en vivo (21)	2,86 en 15,50	S.D.
8-cellig	16-cellig	i.c.	( 7) en vivo (21)	56,27 en 55,50	N.S.D.
2-cellig	4-cellig	vitro	(10) en vivo (30)	22,61 en 15,48	S.D.
2-cellig	8-cellig	vitro	( 7) en vivo (22)	22,56 en 15,47	S.D.
4-cellig	4-cellig	vitro	(19) en vivo (30)	54,18 en 40,23	S.D.
8-cellig	8-cellig	vitro	( 7) en vivo (22)	73,53 en 55,87	S.D.

foto 30 opnieuw gegroepeerd. Op foto 31 zijn de beelden ten opzichte van foto 30 een kwart slag naar rechts gedraaid.

Van wezenlijk betere kwaliteit, als gevolg van een sterkere mikroskopische vergroting, is de volgende serie, foto's 32 – 35. In deze serie wordt de ontwikkeling van diploïde parthenogenonten type 2pn geïllustreerd vanaf het pronucleusstadium tot en met het viercellig stadium. Zeer duidelijk zijn de beide pronuclei in de parthenogenonten zichtbaar evenals het later oplossen van die pronuclei. Na de eerste klievingsdeling zijn de gevormde kernen goed te onderscheiden op foto 33 beelden 13 en 14. De parthenogenont links onder in het eerste beeld van foto 32 vertoont een enigszins afwijkend delingspatroon. Na de eerste klievingsdeling treden bij een van de twee cellen geruime tijd membraancontracties op (foto 33 beeld 1 tot en met foto 34 beeld 21). Ook een van de twee cellen van de parthenogenont midden onder in beeld op foto 33 beeld 16 vertoont dit verschijnsel in geringere mate.

De laatste serie, foto 36, tenslotte geeft een beeld van de ontwikkeling van een diploïde parthenogenont vanaf het eencellig stadium tot en met het blastocyststadium.

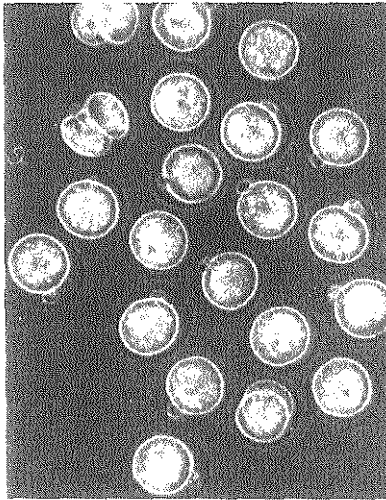
Waarnemingen betreffende de gemiddelde ontwikkelingssnelheden van de verschillende typen parthenogenonten en embryo's staan vermeld in tabel VIII – 1. Tevens is aangegeven het aantal embryo's waaruit het gemiddelde is berekend en de standaard deviatie.

In tabel VIII – 2 zijn de gemiddelde tijdstippen (met standaarddeviatie) bepaald waarop de verschillende typen embryo's en parthenogenonten respectievelijk het twee-, vier- en achtcellig stadium bereikt hebben. Dit zijn dus dezelfde waarnemingen als vermeld in tabel VIII – 1 doch nu opgegeven in uren en minuten en slechts voor het twee-, vier- en achtcellig stadium.

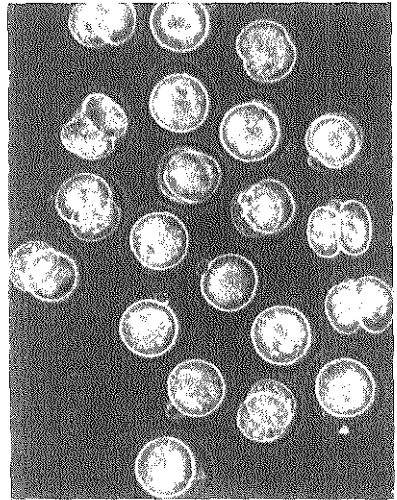
In tabel VIII – 3 zijn de gemiddelde ontwikkelingstijden berekend van de eerste, tweede en derde celgeneraties (respectievelijk GI, GII en GIII), van de verschillende typen parthenogenonten en embryo's. Deze tijden werden als volgt berekend: zie G – I, G – II en G – 111 plus Tabel VIII – 3 Om de mogelijke correlatie te bepalen tussen de ontwikkelingssnelheid in de beginfase van de embryonale ontwikkeling en de vitaliteit gemeten aan de hand van het bereikte eindstadium werden de tijdstippen waarop bepaalde ontwikkelingsstadia bereikt waren van overeenkomstige embryo's met elkaar vergeleken met dien verstande dat zij in groepen werden ingedeeld naar het eindstadium dat zij later zouden bereiken. De verschillen werden op significantie getoetst volgens de toets van Student. De resultaten van deze berekeningen zijn weergegeven in tabel VIII – IV. In deze tabel worden bij zich verder en minder ver ontwikkelende embryo's de intervallen die nodig zijn om het geanalyseerde stadium te bereiken vergeleken.



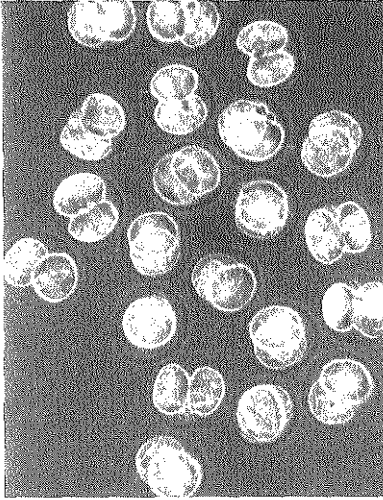
FOTO 22  
IN VIVO BEVRUCHTE EMBRYO'S



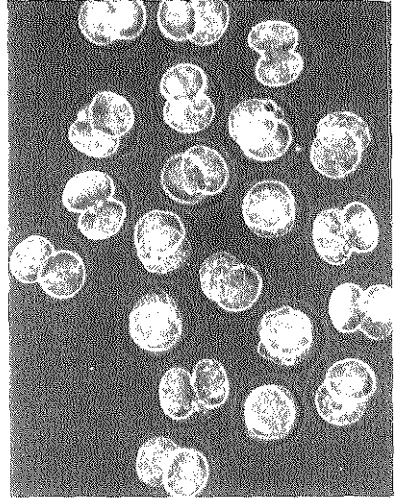
1. 14 uur en 30 min.



2. 15 uur en 12 min.

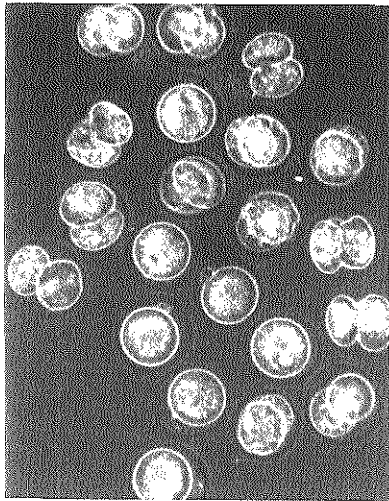


5. 16 uur en 44 min.

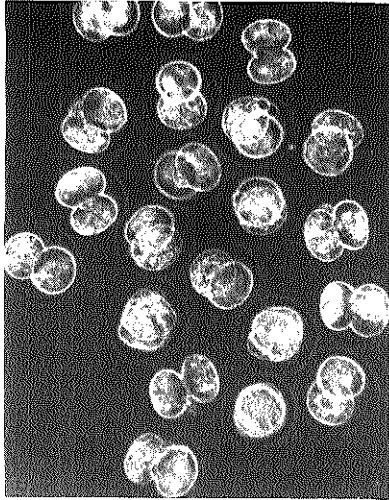


6. 17 uur en 12 min.

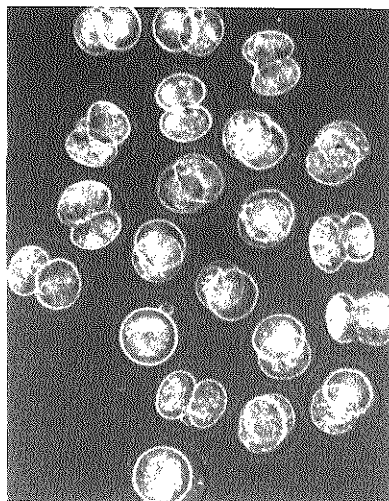




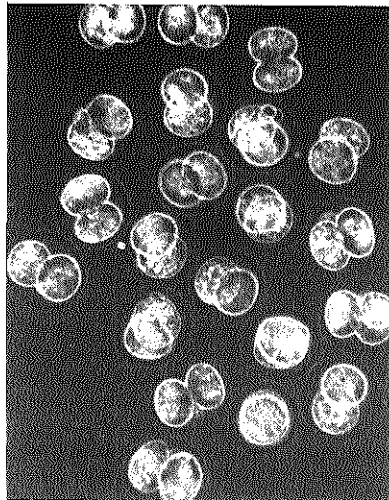
3. 15 uur en 42 min.



7. 17 uur en 45 min.

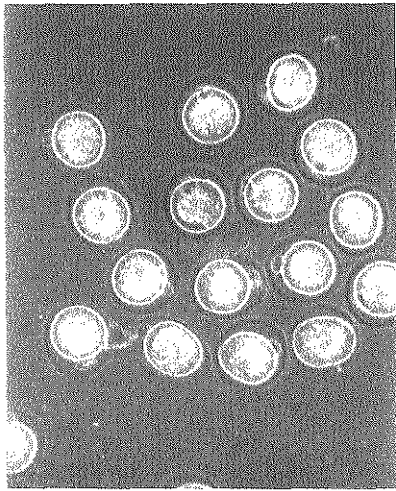


4. 16 uur en 14 min.

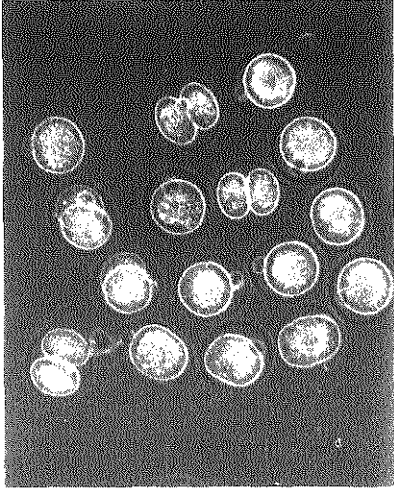


8. 18 uur en 17 min.

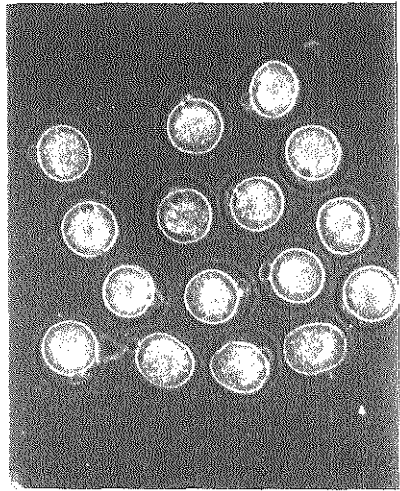
FOTO 23  
IN VIVO BEVRUCHTE EMBRYO'S



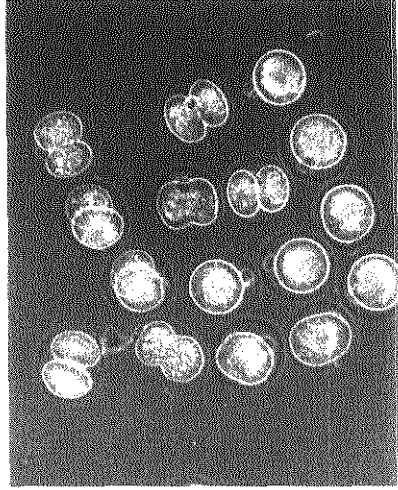
1. 14 uur en 26 min.



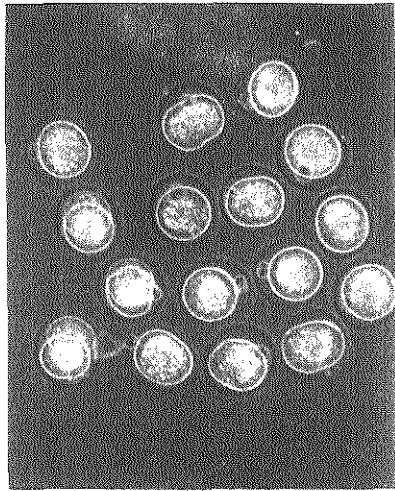
5. 15 uur en 3 min.



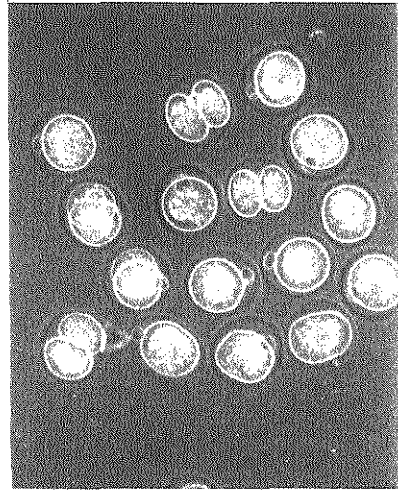
2. 14 uur en 35 min.



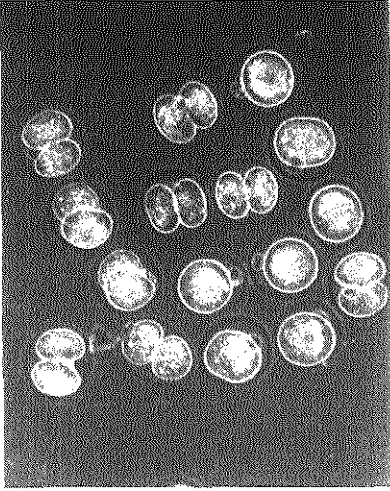
6. 15 uur en 12 min.



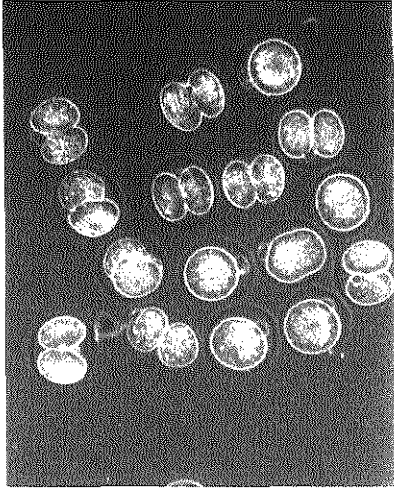
3. 14 uur en 44 min.



4. 14 uur en 54 min.

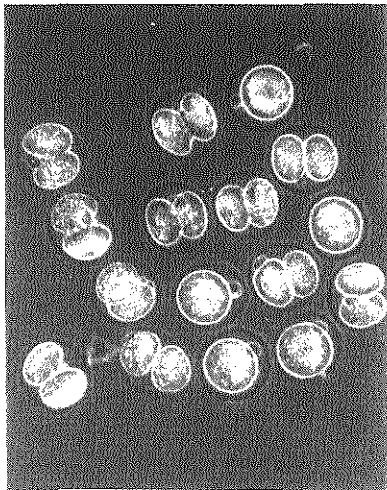


7. 15 uur en 22 min.

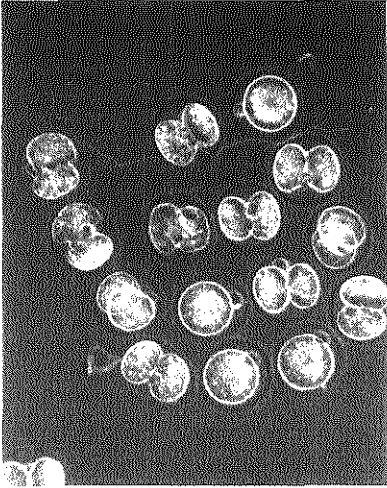


8. 15 uur en 31 min.

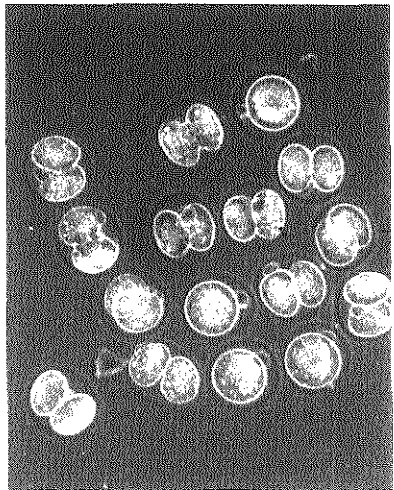
FOTO 24  
IN VIVO BEVRUCHE EMBRYO'S



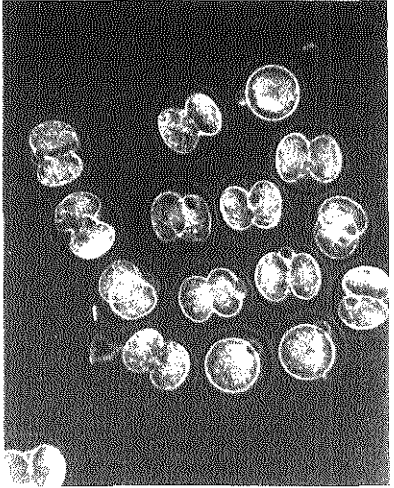
9. 15 uur en 40 min.



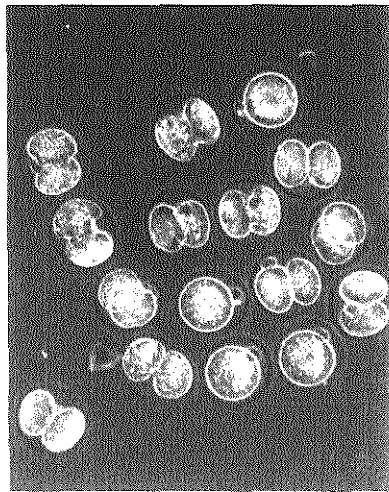
13. 16 uur en 18 min.



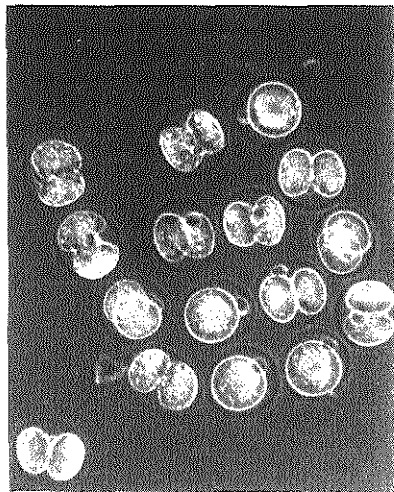
10. 15 uur en 50 min.



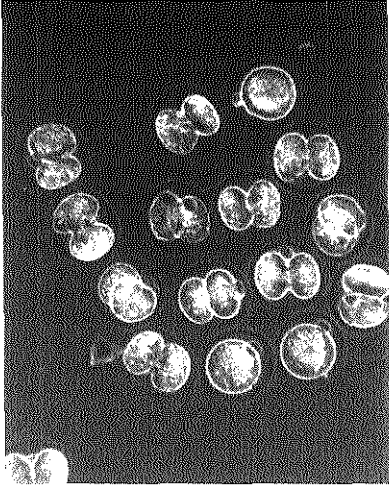
14. 16 uur en 27 min.



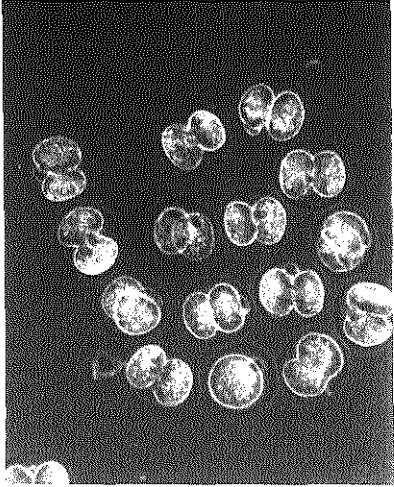
11. 15 uur en 59 min.



12. 16 uur en 8 min.

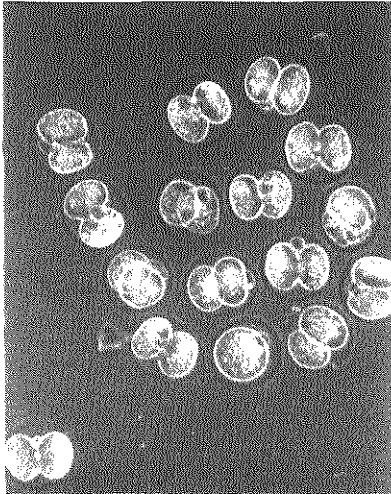


15. 16 uur en 36 min.

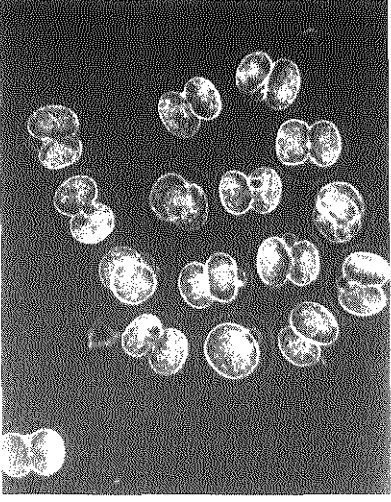


16. 16 uur en 46 min.

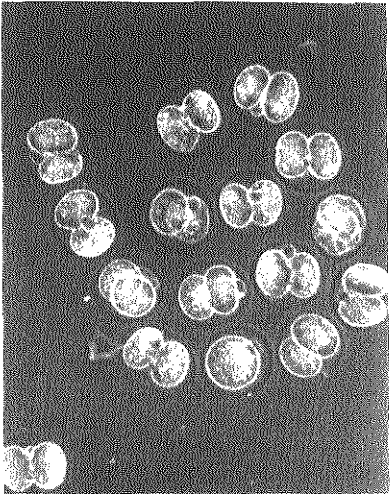
FOTO 25  
IN VIVO BEVRUCHE EMBRYO'S



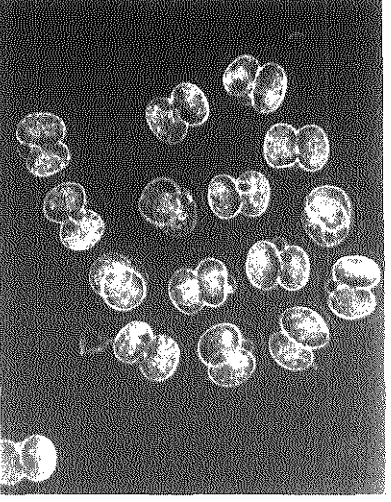
17. 16 uur en 55 min.



19. 17 uur en 14 min.



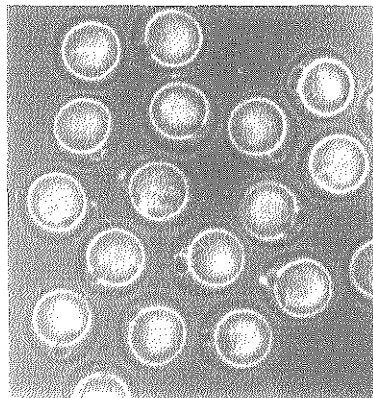
18. 17 uur en 4 min.



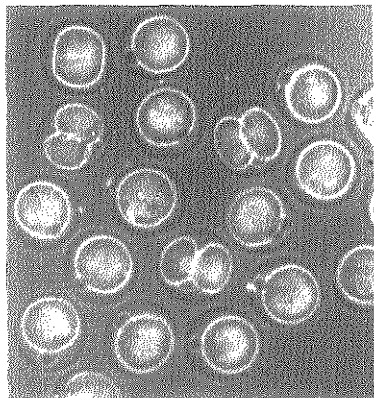
20. 17 uur en 23 min.



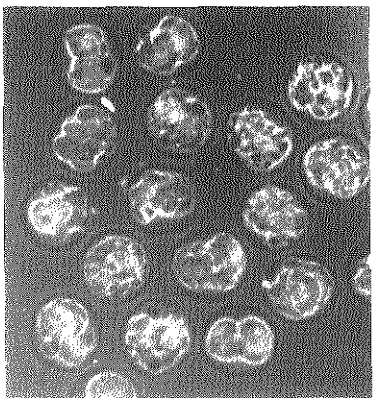
FOTO 26  
HAPLOÏDE PARTHENOGENONTEN TYPE 2PBIPN



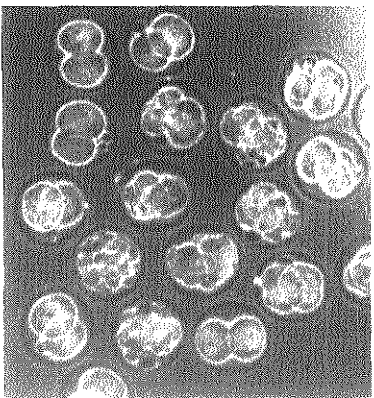
1. 16 uur en 39 min.



2. 17 uur en 21 min.

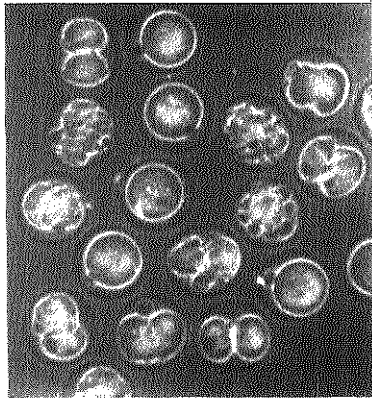


5. 19 uur en 40 min.

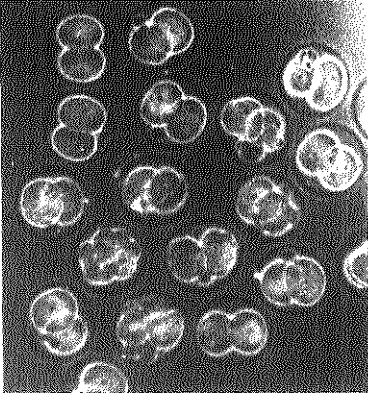


6. 21 uur en 14 min.

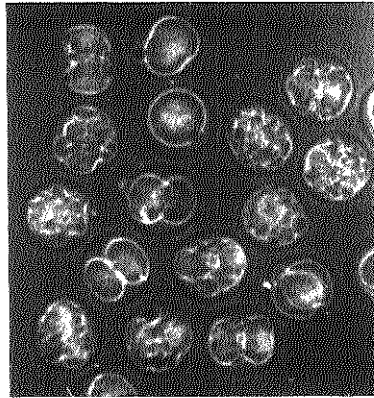




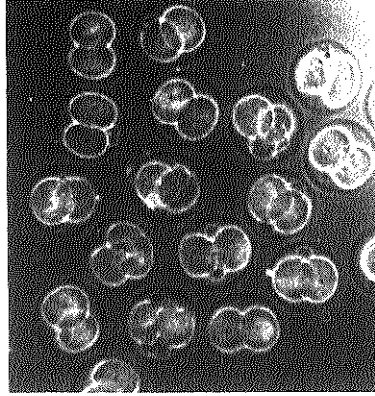
3. 17 uur en 56 min.



7. 22 uur en 31 min.

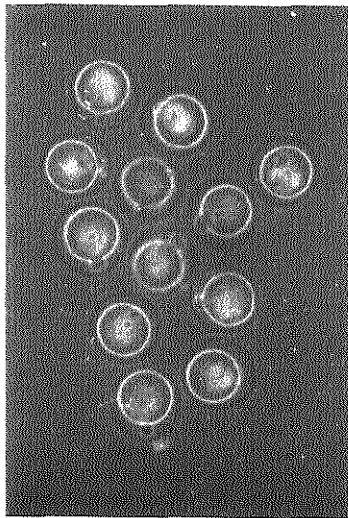


4. 18 uur en 27 min.



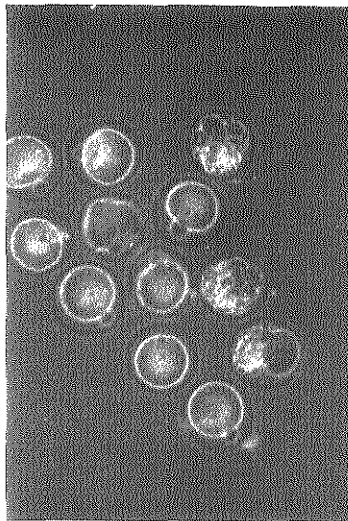
8. 24 uur en 10 min.

FOTO 27  
HAPLOÏDE PARTHENOGENONTEN TYPE 2PB1PN



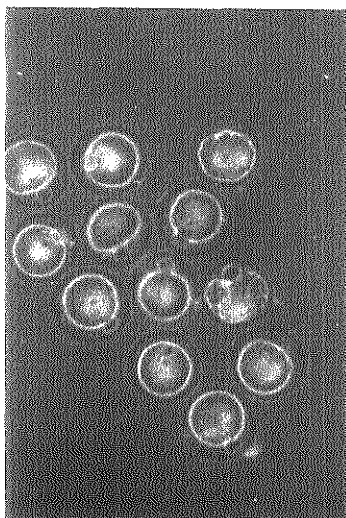
1.

8 uur en 9 min.



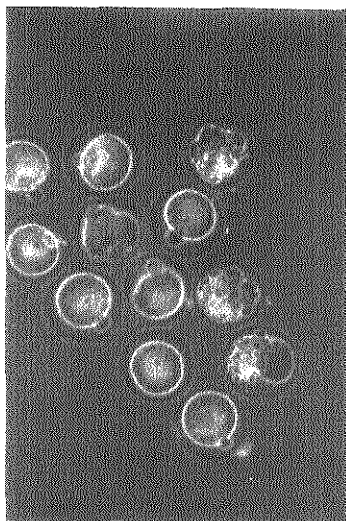
5.

15 uur en 30 min.



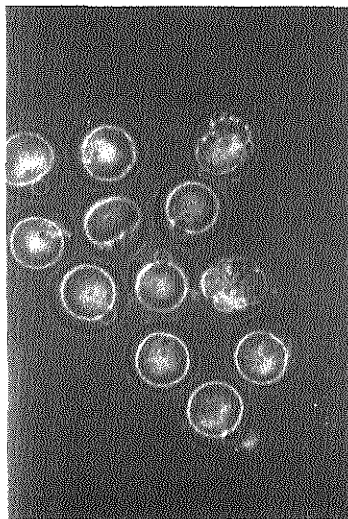
2.

12 uur en 0 min.

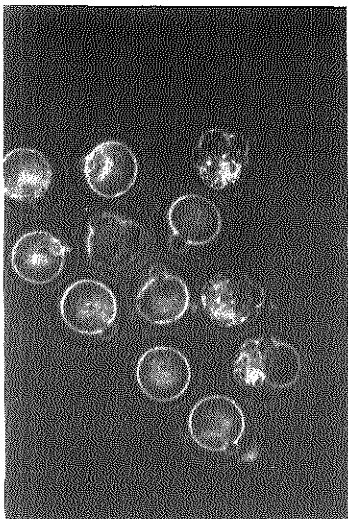


6.

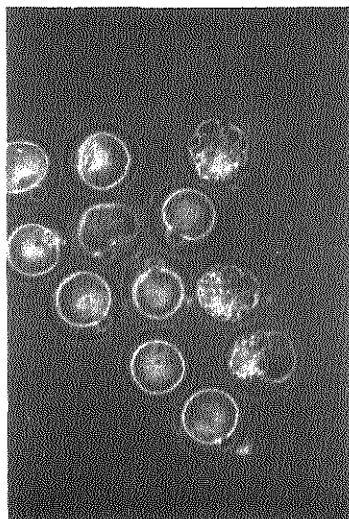
16 uur en 30 min.



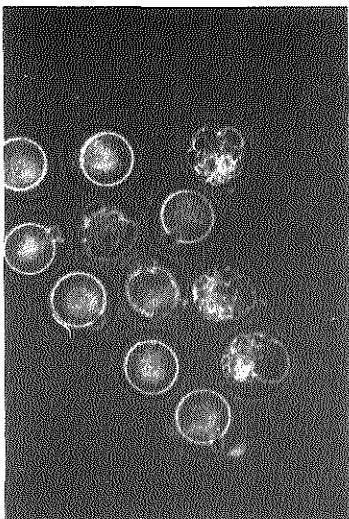
3. 12 uur en 30 min.



7. 17 uur en 0 min.

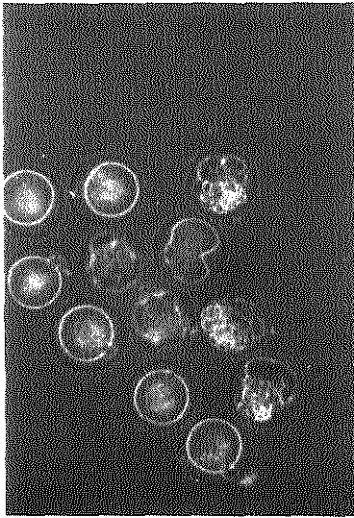


4. 14 uur en 30 min.

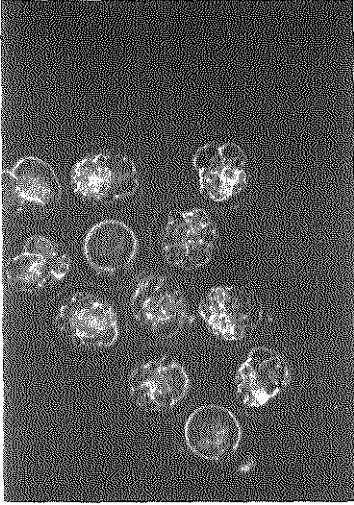


8. 18 uur en 30 min.

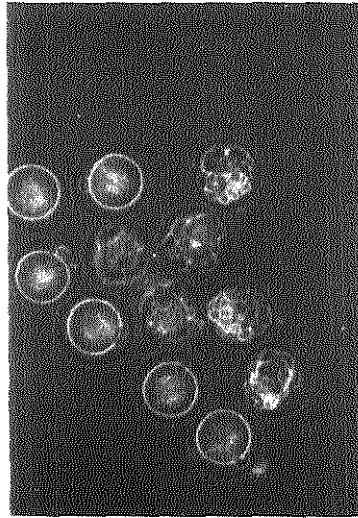
FOTO 28  
HAPLOÏDE PARTHENOGENONTEN TYPE 2PBIPN



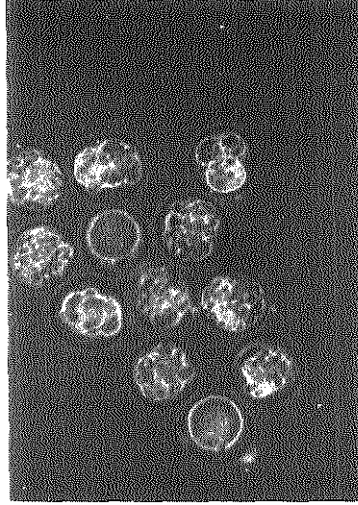
9. 19 uur en 30 min.



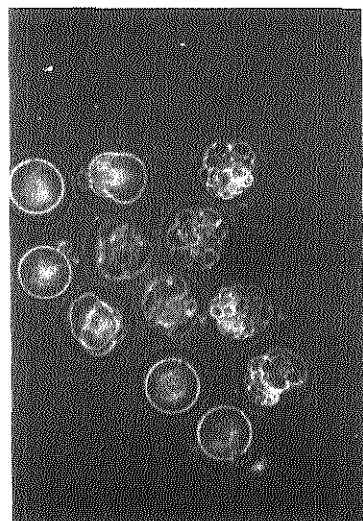
13. 21 uur en 30 min.



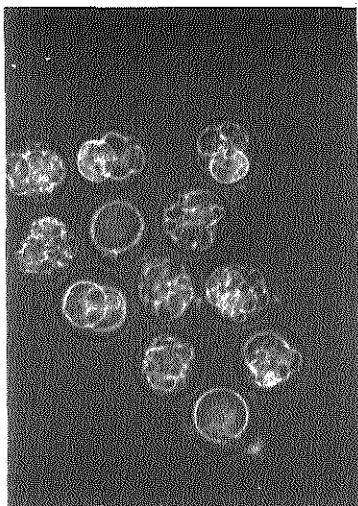
10. 20 uur en 0 min.



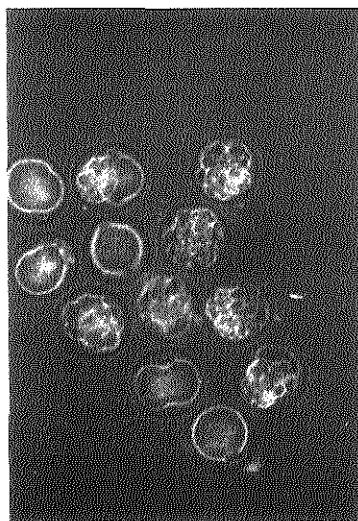
14. 22 uur en 30 min.



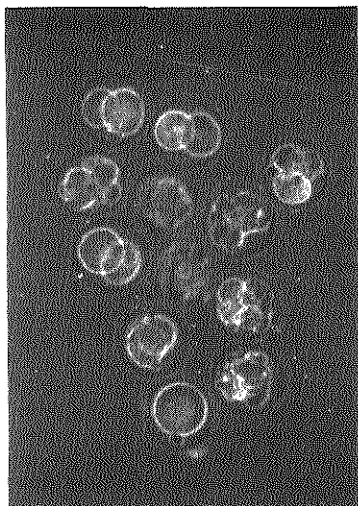
11. 20 uur en 30 min.



15. 23 uur en 30 min.

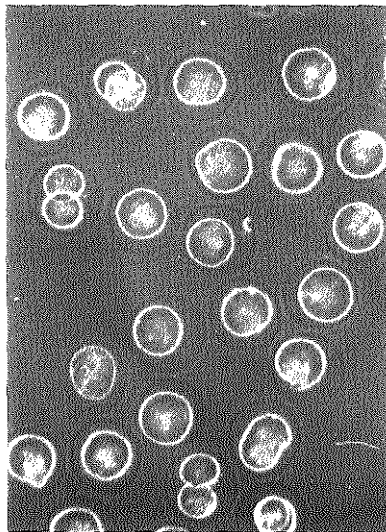


12. 21 uur en 0 min.

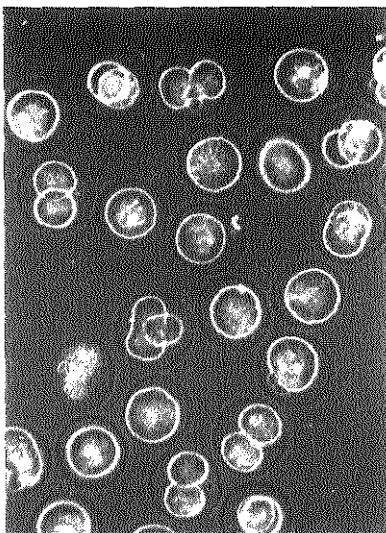


16. 25 uur en 10 min.

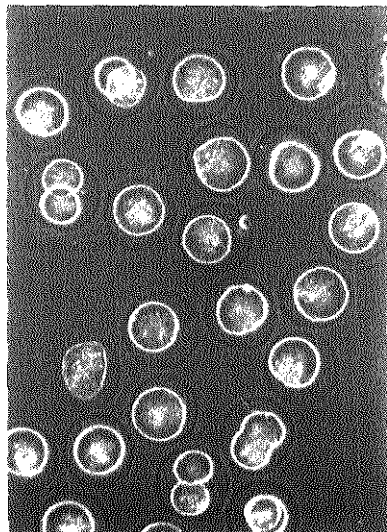
FOTO 29  
HAPLOÏDE PARTHENOGENONTEN TYPE I.C.



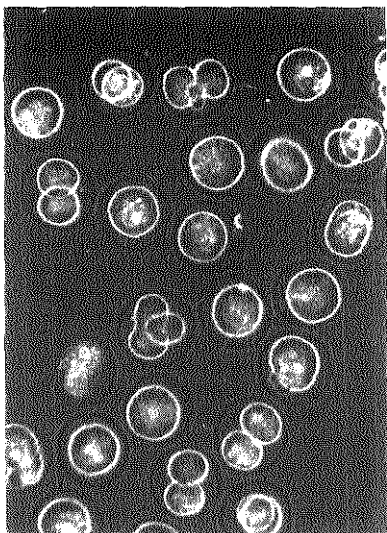
1. 3 uur en 21 min.



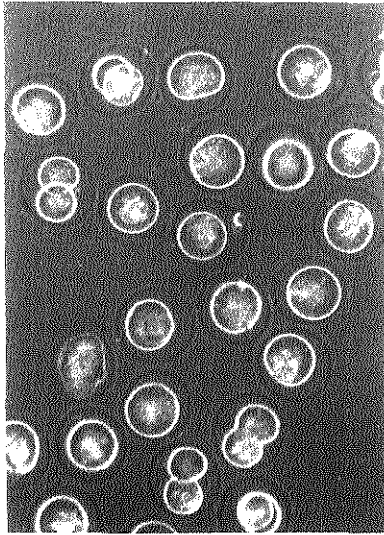
5. 8 uur en 57 min.



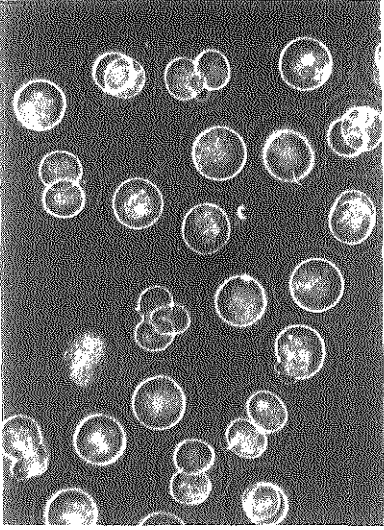
2. 4 uur en 9 min.



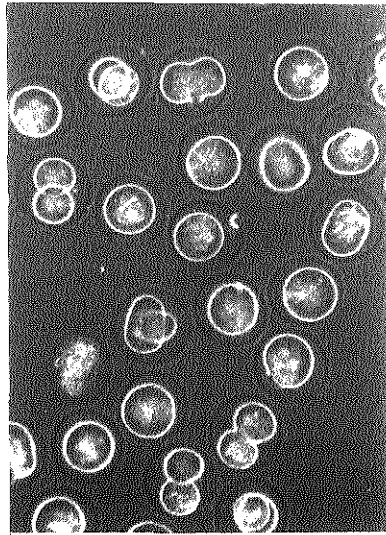
6. 9 uur en 45 min.



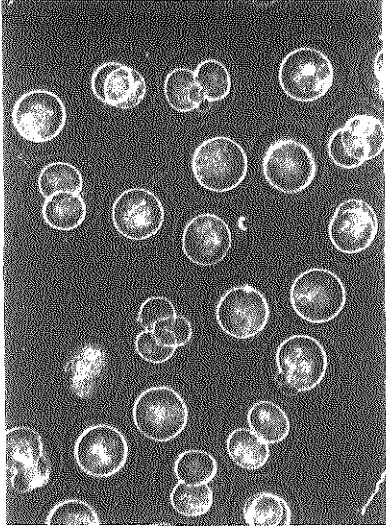
3. 5 uur en 45 min.



7. 11 uur en 21 min.

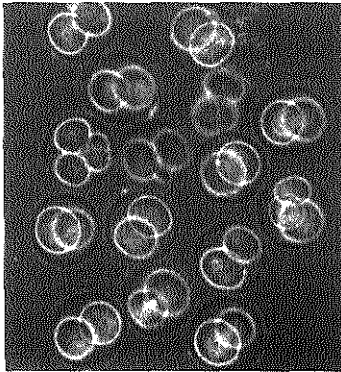


4. 7 uur en 21 min.

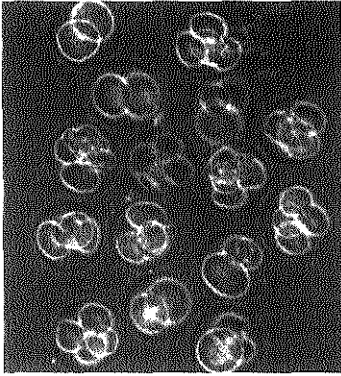


8. 12 uur en 9 min.

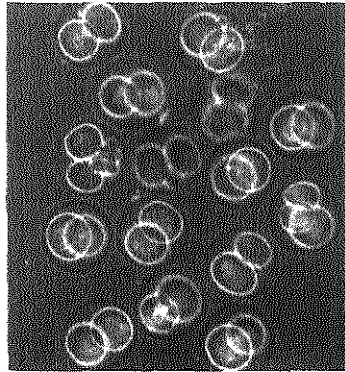
FOTO 30  
HAPLOÏDE PARTHENOGENONTEN TYPE I.C.



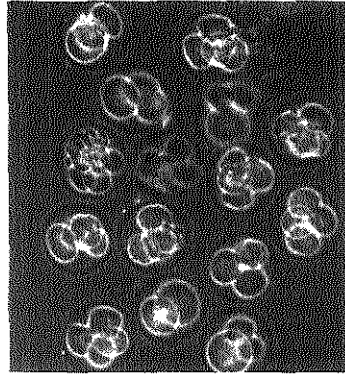
9. 18 uur en 9 min.



13. 20 uur en 39 min.

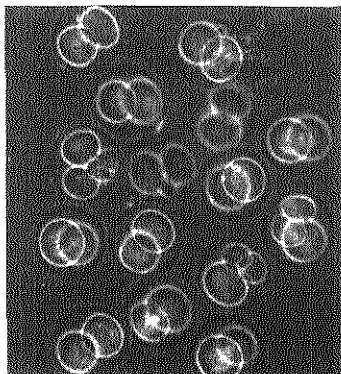


10. 18 uur en 39 min.

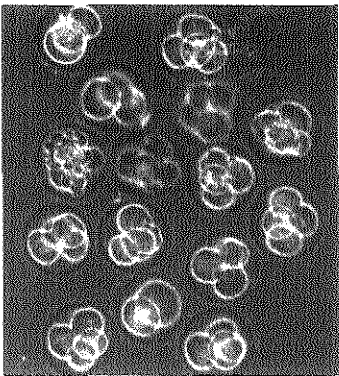


14. 21 uur en 9 min.

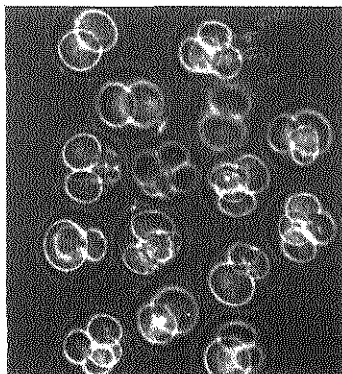




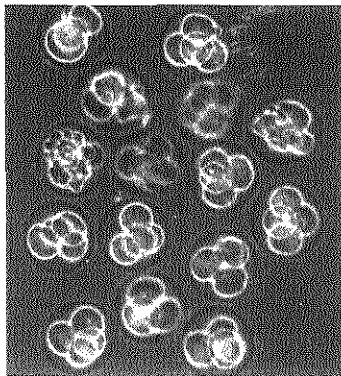
11. 19 uur en 9 min.



15. 21 uur en 39 min.

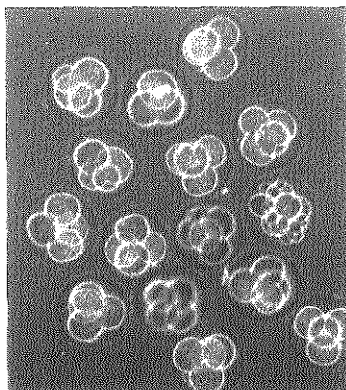


12. 20 uur en 9 min.

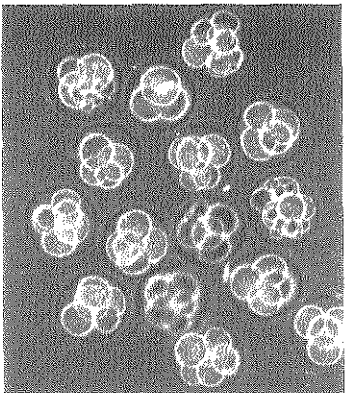


16. 22 uur en 9 min.

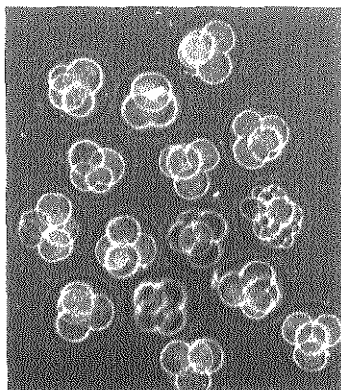
FOTO 31  
HAPLOÏDE PARTHENOGENONTEN TYPE I.C.



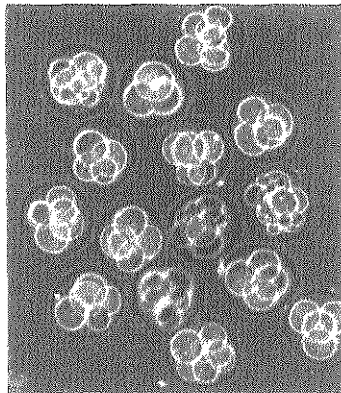
17. 47 uur en 0 min.



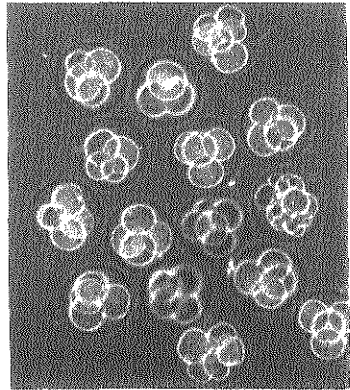
21. 49 uur en 48 min.



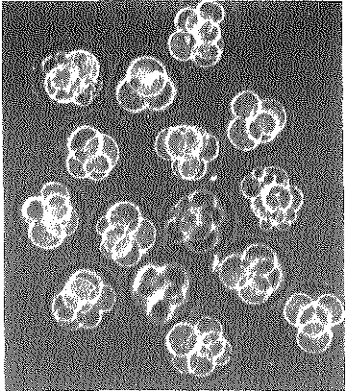
18. 47 uur en 24 min.



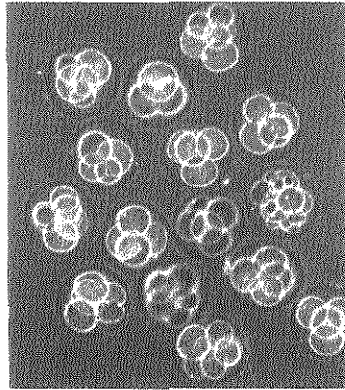
22. 50 uur en 36 min.



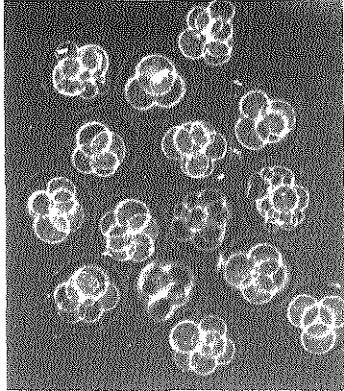
19. 48 uur en 12 min.



23. 51 uur en 24 min.

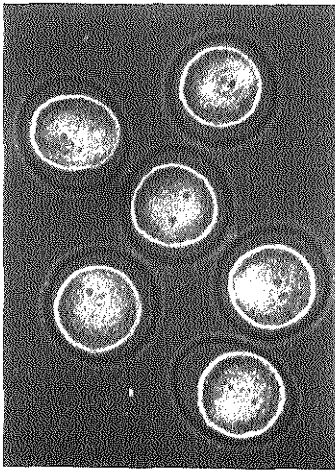


20. 49 uur en 0 min.

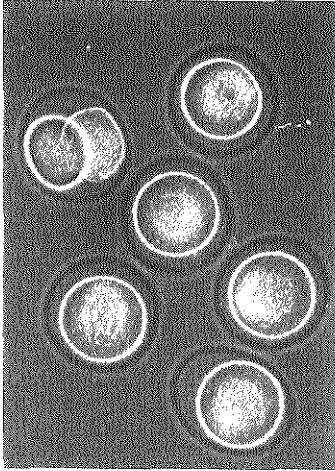


24. 52 uur en 12 min.

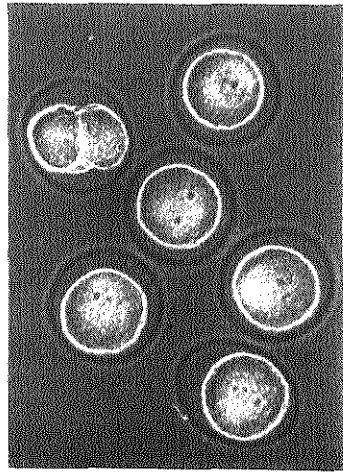
FOTO 32  
DIPLOÏDE PARTHENOGENONTEN TYPE 2PN



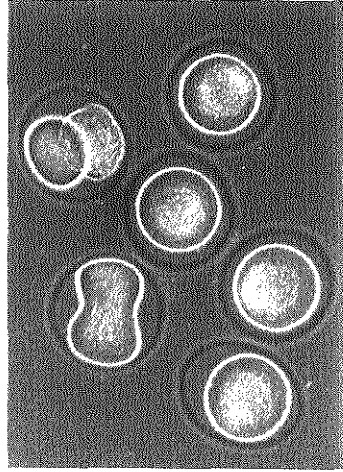
1. 9 uur en 42 min.



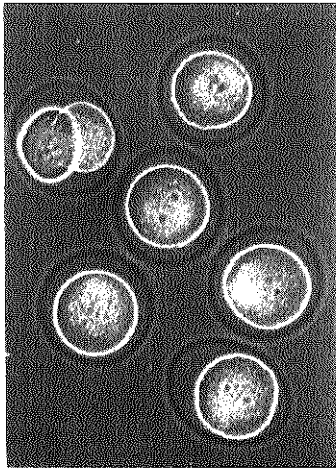
5. 16 uur en 16 min.



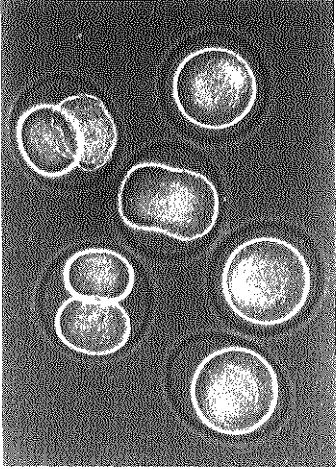
2. 11 uur en 16 min.



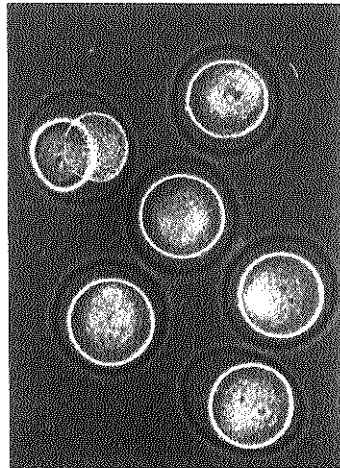
6. 16 uur en 41 min.



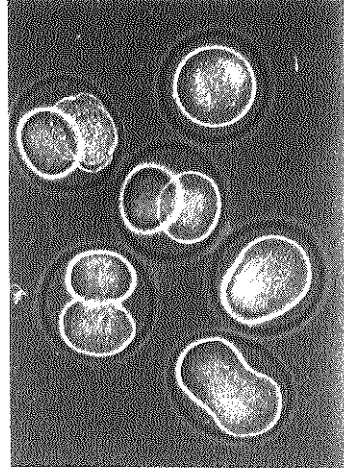
3. 14 uur en 46 min.



7. 17 uur en 3 min.

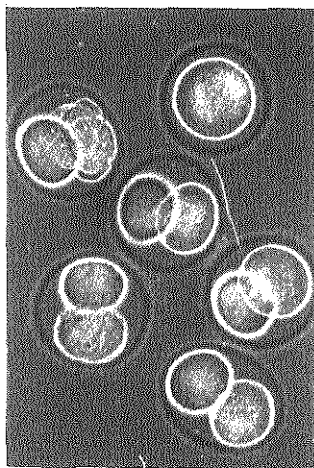


4. 15 uur en 10 min.

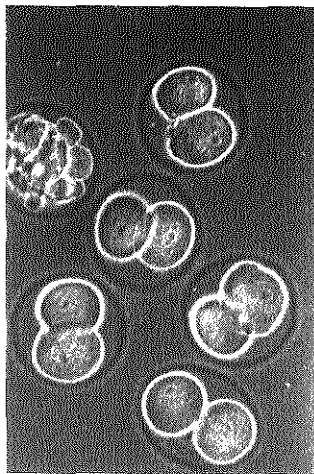


8. 17 uur en 26 min.

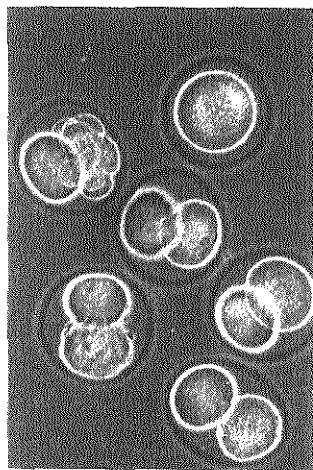
FOTO 33  
DIPLOÏDE PARTHENOGENONTEN TYPE 2PN



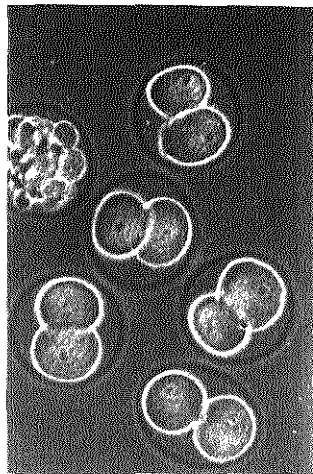
9. 17 uur en 48 min.



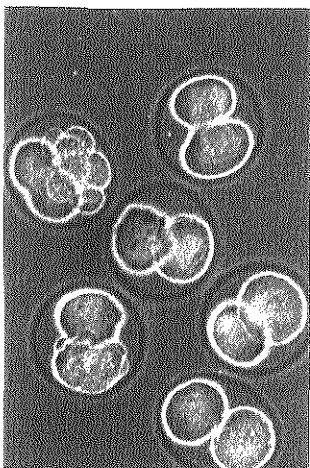
13. 19 uur en 41 min.



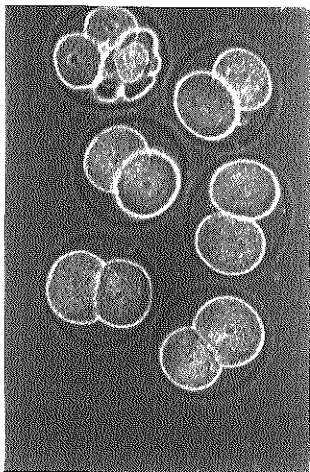
10. 18 uur en 11 min.



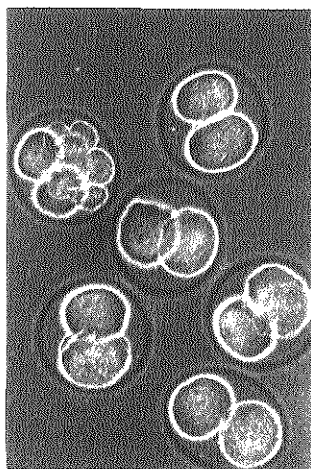
14. 20 uur en 3 min.



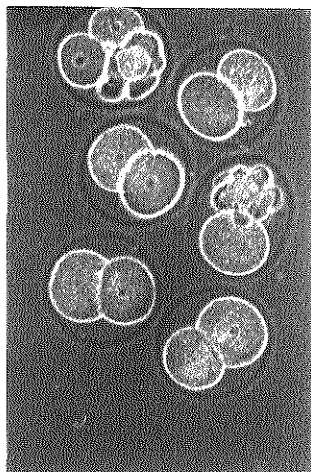
11. 18 uur en 34 min.



15. 52 uur en 44 min.



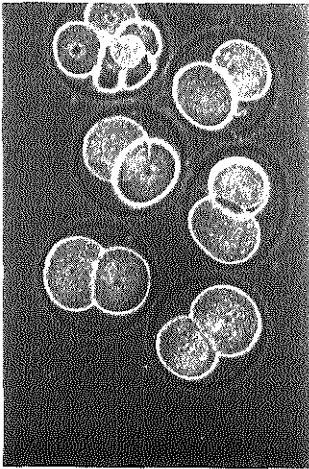
12. 18 uur en 56 min.



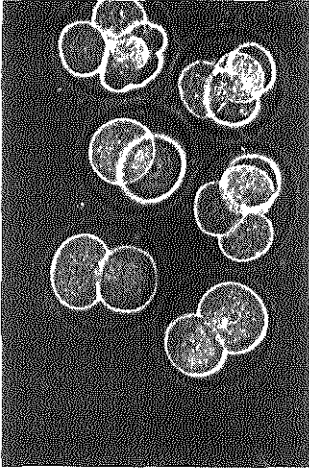
16. 53 uur en 0 min.

FOTO 34

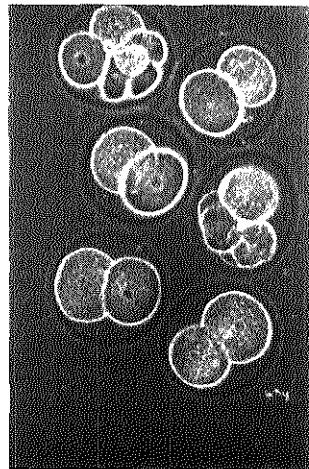
DIPLOÏDE PARTHENOGENONTEN TYPE 2PN



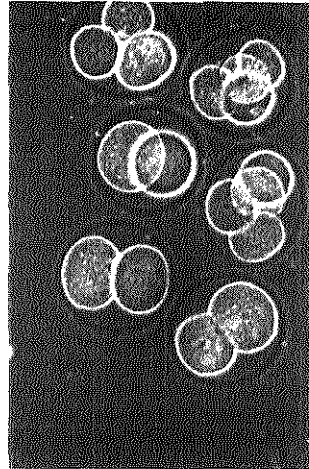
17. 53 uur en 30 min.



21. 54 uur en 45 min.

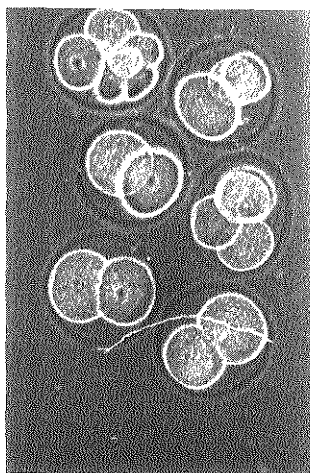


18. 53 uur en 45 min.

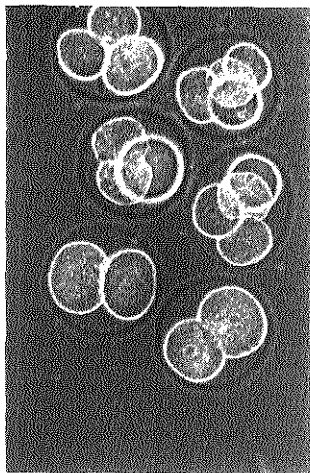


22. 55 uur en 0 min.

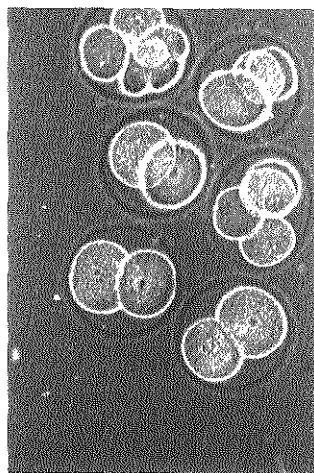




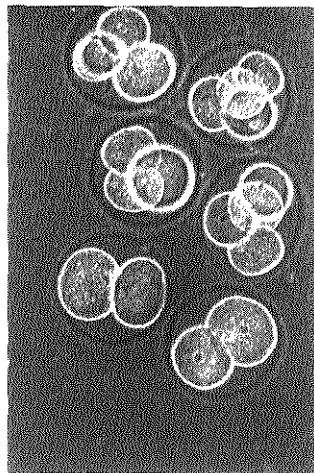
19. 54 uur en 0 min.



23. 56 uur en 0 min.

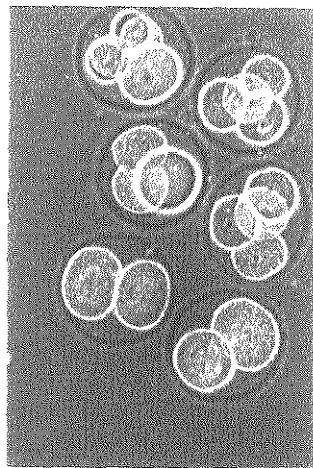


20. 54 uur en 15 min.

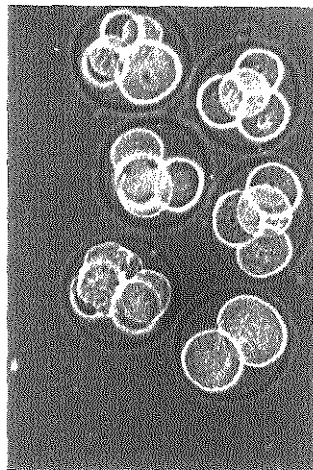


24. 56 uur en 15 min.

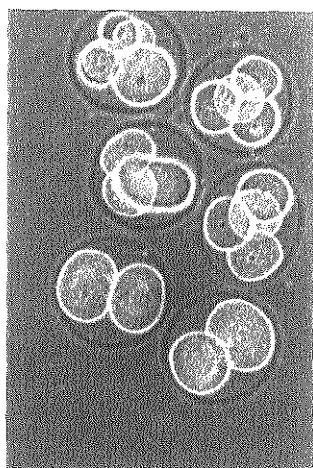
FOTO 35  
DIPLOÏDE PARTHENOGENONTEN TYPE 2PN



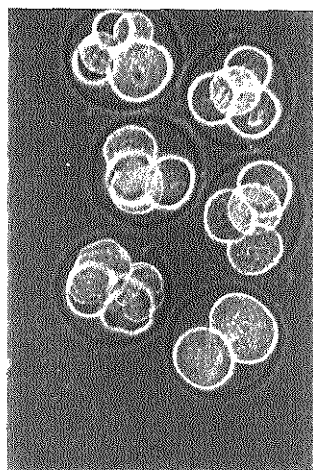
25. 56 uur en 45 min.



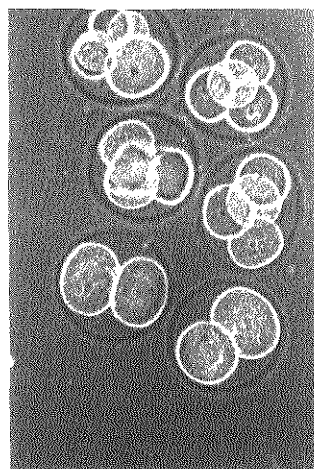
29. 58 uur en 45 min.



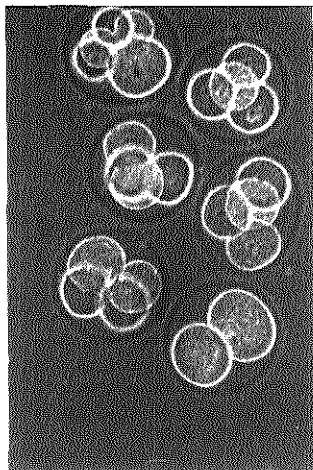
26. 57 uur en 0 min.



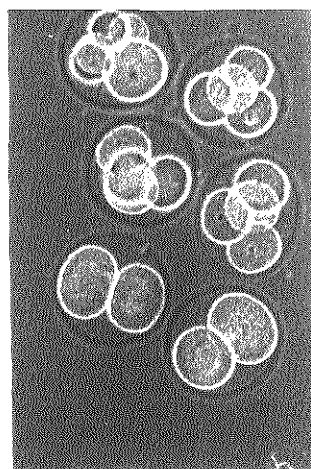
30. 59 uur en 0 min.



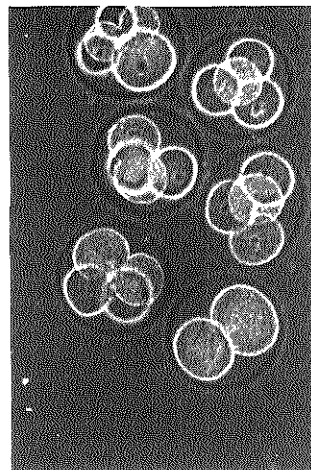
27. 58 uur en 0 min.



31. 59 uur en 15 min.

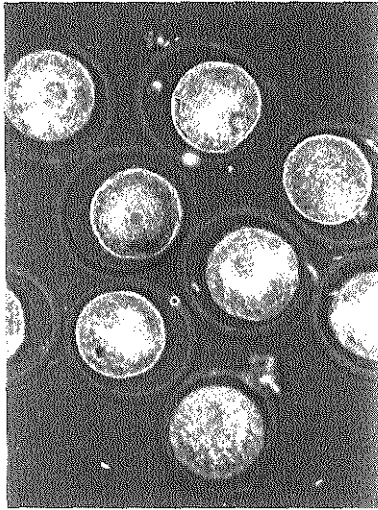


28. 58 uur en 15 min.

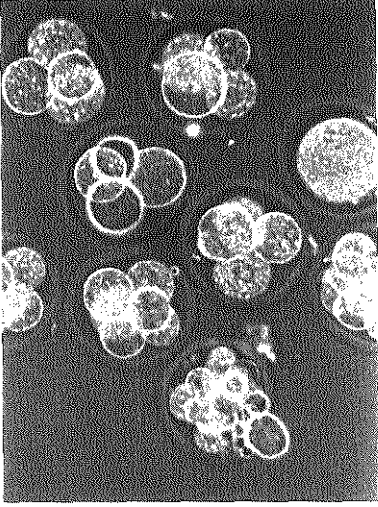


32. 59 uur en 30 min.

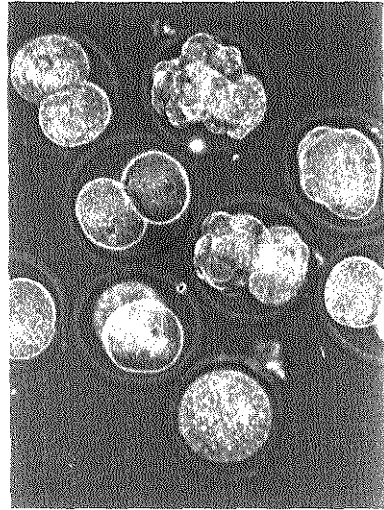
FOTO 36  
DIPLOÏDE PARTHENOGENONTEN



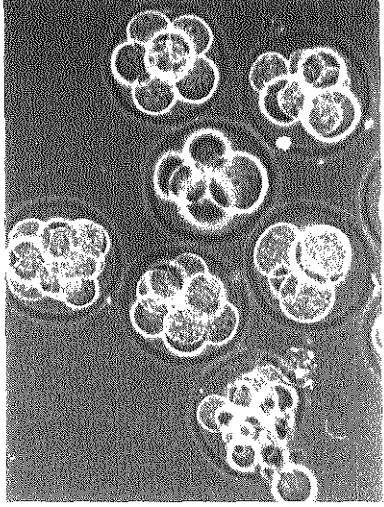
1. 8 uur en 34 min.



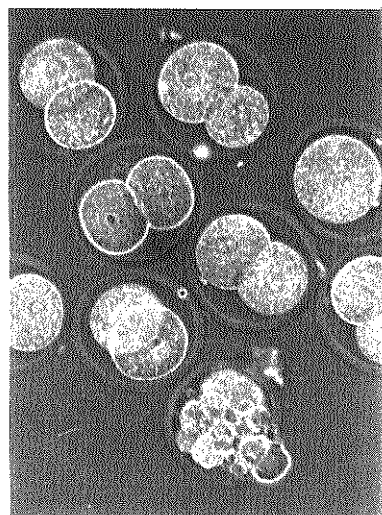
5. 69 uur en 24 min.



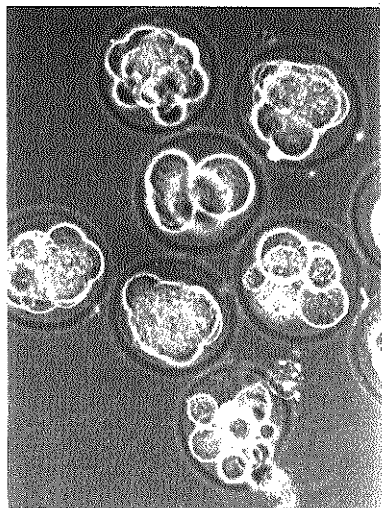
2. 20 uur en 34 min.



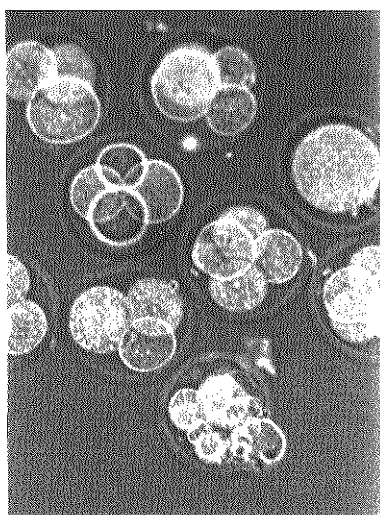
6. 79 uur en 24 min.



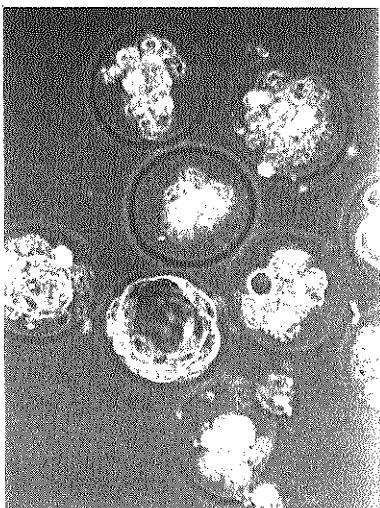
3. 42 uur en 19 min.



7. 103 uur en 36 min.



4. 54 uur en 24 min.



8. 144 uur en 41 min.

Het sneller bereiken van het tweecellig stadium ten opzichte van de overige embryo's of parthenogenonten in dezelfde groep duidt alleen bij haploïde parthenogenonten type 2pb1pn op een grotere kans om een verder ontwikkeld eindstadium te bereiken. Retrospectief blijkt dat bij de typen parthenogenonten 2pn of 1pn en i.c. het viercellig stadium sneller wordt bereikt door embryo's die zich verder ontwikkelen. Bij de in vivo bevruchte eicellen wordt dit stadium echter door beide groepen even snel bereikt. Een vertraagde ontwikkeling van de tweede celgeneratie bij parthenogenonten houdt dus waarschijnlijk verband met een geringere vitaliteit. Deze conclusie geldt eveneens voor de vorming van de derde celgeneratie waarbij men het vroeger of later bereiken van het achtcellig stadium als criterium hanteert.

Bij de in vivo bevruchte embryo's en de i.c. – parthenogenonten is de vitaliteit, zich manifesterend in het eindstadium van de ontwikkeling van het embryo, niet gecorreleerd met het tijdstip waarop het tweecellig stadium bereikt wordt. Wel is dit bij de i.c. parthenogenonten het geval bij het ontstaan van de tweede celgeneratie, dus het bereiken van het viercellig stadium. In deze categorie parthenogenonten wordt het viercellig stadium sneller bereikt in de groep die zich voorbij het zestien-cellig – (morula) – stadium ontwikkelen vergeleken met de groep embryo's die niet voorbij het dertien-cellig stadium komen.

Tenslotte werden de verschillen in ontwikkelingssnelheden op significantie getoetst tussen enerzijds in vivo bevruchte embryo's en anderzijds de overige typen parthenogenonten en de in vitro bevruchte embryo's. Deze verschillen zijn weergegeven in tabel VIII – V. Steeds werden groepen vergeleken die eenzelfde eindstadium bereikt hadden.

Het blijkt, behalve uiteraard bij de i.c. – parthenogenonten, dat alle typen parthenogenonten en de in vitro bevruchte embryo's zich significant langzamer ontwikkelen dan de in vivo bevruchte embryo's.

De i.c. – parthenogenonten ontwikkelen zich aanvankelijk sneller doch het achtcellig stadium wordt nagenoeg gelijktijdig bereikt. Dit komt doordat de eerste en de tweede celgeneratie zoveel sneller ontstaat bij de i.c. – parthenogenonten (respektievelijk  $15h30' - 2h58' = 12h32'$  en  $23h58' - 16h29' = 7h29'$ , tabel VIII – III) doch de derde celgeneratie heeft een langere generatietijd ( $34h54' - 15h27' = 19h27'$ ).

#### VIII – 4    Discussie

Het primaire doel van deze filmopnamen was een indruk te krijgen van de ontwikkelingssnelheid van drie typen parthenogenonten en van in vivo en in vitro bevruchte eicellen alsmede van enige morfologische aspecten van deze ontwikkelingen. Om in vrij korte tijd meer resultaten te kunnen krijgen werden daartoe mikroskopische filmopnamen gemaakt met een vrij kleine vergroting waardoor het mogelijk werd groepen van 15 – 20 embryo's tegelijkertijd te filmen.

Consequentie van deze geringe vergroting is echter wel dat er minder details zichtbaar worden in de films, zodat daar slechts in beperkte mate aandacht aan besteed kan worden!

Bij vergelijking van de hier gemelde resultaten met andere onderzoeken is het belangrijk zich te realiseren dat genetische factoren van de moeder een rol kunnen spelen in de timing van de vroege ontwikkeling van de muis (McLaren en Bowman, 1973 en Shire & Whitten, 1980 – B)

Hoewel algemeen wordt aangenomen dat de delingssnelheid van bevruchte eicellen met name door het cytoplasma van de eicel wordt bepaald (reviews: Briggs & King, 1959; Swann, 1957; Brachet, 1957 en Niwa et al., 1980) toonden Whitten & Dagg (1961) tevens aan dat het genotype van de bevruchtende zaadcel een invloed uitoefent op de tijdsduur tussen de eerste en de tweede klievingsdeling. Later werd eveneens aangetoond dat ook het moment van de eerste klievingsdeling mede bepaald wordt door het genotype van de bevruchtende zaadcel (Shire & Whitten, 1980 – A en Tessler & Olds – Clarke, 1981). Recent is zelfs aangetoond dat de ontwikkelingssnelheid van muize – embryo's tot het moment van implantatie onder invloed van genen staat (Goldbard & Warner, 1982). Krzanowska (1964) toonde bovendien aan dat zaadcellen van ingeteelde muize stammen meer tijd nodig hebben om de eicel te penetreren dan zaadcellen van bastaarden. Het was reeds bekend dat ingeteelde stammen een lager percentage morfologisch en fysiologisch normale zaadcellen hadden (Sharma, 1960; Mori, 1961; Krzanowska, 1962). Ook zijn er verschillen tussen muize stammen met betrekking tot de tijd die de zaadcellen nodig hebben om de eicellen van de cumuluscellen te ontdoen (Braden, 1958). Al deze factoren maken een vergelijk van de hier beschreven resultaten met elders in de literatuur vermelde resultaten een moeilijke zaak.

Een van de meest opvallende fenomenen in het eigen onderzoek is de snelle vervaging van de blastomeergrenzen, met andere woorden het sneller aannemen van de morula – configuratie, van de in vivo bevruchte embryo's (engelse woord "compaction"). In hoeverre dit mede een manifestatie is van de hogere vitaliteit van dit type embryo is niet duidelijk vast te stellen. Ook Leonov en medewerkers konden in soortgelijke experimenten slechts tot het achtcellig stadium de individuele blastomeren onderscheiden. Wel lijkt de in vitro bevruchting en daarop volgende in vitro ontwikkeling onder de huidige proefomstandigheden minder succesvol te verlopen dan de in vitro ontwikkeling van de in vivo bevruchte embryo's, gezien de zoveel langere generatietijd van de eerste celpopulatie in de eerstgenoemde groep. In beide categorieën wordt echter waargenomen dat de tweede en derde celgeneratie zich nagenoeg even snel ontwikkelen. Ook door Bowman en McLaren werd een sterke vertraging in de ontwikkelingssnelheid, zowel in het aantal cellen alsmede de diameter, waargenomen bij in vitro gekweekte embryo's ten opzichte van de in vivo gegroeide embryo's (Bowman & McLaren, 1970). Door Miyamoto en Chang (1972) werd een vertraagde ontwikkeling van het tweecellig stadium van in vitro bevruchte muize – eicellen ten opzichte van in vivo bevruchte gevonden. Wel gaven beide groepen na 96 uur gelijke percentages morula's en blastocysten. Een mogelijke

reden voor de latere eerste klievingsdeling bij de in vitro bevruchte eicellen is het feit dat er niet in vivo gecapaciteerd sperma aan de te bevruchten eicellen werd toegevoegd.

De door Leonov en medewerkers (Leonov et al., 1972) gevonden derde generatietijd, 12h14', van in vivo bevruchte embryo's is iets korter dan de hier gevonden tijd: 15h27'. De oorzaak van deze kortere generatietijd is waarschijnlijk het feit dat de embryo's welke in de experimenten van Leonov werden gebruikt pas 25 – 28 uur na de bevruchting als tweecelligen geïsoleerd werden, terwijl in de hier gemelde experimenten zij reeds circa 14 uur na de bevruchting (nog in het pronucleusstadium verkerend) geïsoleerd en vervolgens gefilmd werden.

Kaufman (1973 – B,C) nam waar dat bij 15 – 22 uur na ovulatie geïsoleerde bevruchte eicellen de eerste klievingsdeling circa 19h30' na ovulatie plaatsvindt (22% na 18h30' en 71% na 20h00'). Deze tijd is af te leiden uit de gegevens welke Kaufman verkreeg uit chromosoompreparaten. Uit de analyses van filmpopnamen van twaalf embryo's werd ongeveer eenzelfde tijd gevonden: 19h51'.

Een zelfde type onderzoek werd gedaan door Kaufman (Kaufman, 1973) met 7 – 9 uur na superovulatie geïsoleerde eicellen welke door een hyaluronidasebehandeling geactiveerd waren tot haploïde parthenogenonten.

Kennelijk is de langere hyaluronidasebehandeling welke door Kaufman werd toegepast (10 minuten) vergeleken met de hier gebruikte aktivatiemethode van 3 – 5 minuten van grote invloed op het moment waarop de eerste klievingsdeling wordt voltooid: respectievelijk circa 15h00' en 28h30' na inductie.

Jammer is het dat de verdere ontwikkeling van deze tweecelligen niet vervolgd werd door Kaufman zodat geen uitspraak kon worden gedaan over een eventuele geringe vitaliteit na de aanvankelijke snellere aktivatie van deze parthenogenonten.

Mulnard (1967) isoleerde 40 uur na spontane ovulatie en bevruchting tweecellige embryo's uit Swiss – albino vrouwtjes. Ook hij vond een tijdsverschil tussen het optreden van de tweede en derde klievingsdeling, verschil: 50 minuten (84 minuten in dit onderzoek). Tussen de eerste en de laatste deling van de tweede celgeneratie vindt Mulnard ongeveer 80 minuten. Ook deze waarde is in overeenstemming met de hier gevonden tijd: 84 minuten. De generatietijd van de tweede generatie zal derhalve ongeveer 11h55' bedragen. Deze tijd komt overeen met de door Leonov en medewerkers gevonden waarde: 12h14'. Beide tijden zijn veel korter dan de hier gevonden generatietijd van 23h58'.

Borghese en Cassini (1963) vonden bij de in vitro ontwikkeling van konijn – embryo's circa 10 uur tussen het viercellig stadium en het door snel opeenvolgende celdelingen ontstane achtcellig stadium. Voor muize – embryo's komt deze periode in dit onderzoek op circa 18,5 uur.

Interessant is het na te gaan of er verschillen bestaan tussen de vijf typen parthenogenonten en embryo's met betrekking tot de mate van asynchroniteit bij de vorming van de eerste drie celgeneraties. De in tabel VIII – 1 gegeven



standaarddeviatie geeft hiervoor een goede indicatie indien deze getallen gecorreleerd worden met de bijbehorende gemiddelde tijden. Het blijkt dat de in vivo bevruchte embryo's de minste spreiding vertonen in de tijdstippen waarop de klievingsdelingen plaatsvinden. Dit is zeer opvallend bij de eerste klievingsdeling van deze groep embryo's ten opzichte van de andere vier groepen. De reeds eerder genoemde aanname van de morula - configuratie is ook door Mulnard geconstateerd: "les blastomeres glissent les uns sur les autres et semblent chercher, en "s'engrenant", le plus large contact possible entre eux". In een periode van 8h30' verandert het duidelijke achtcellige stadium in een nagenoeg ronde morula configuratie. Bij latere delingen gaat deze ronde contour weer verloren: "tres rapidement, les blastomeres se réarrondissent les uns apres les autres pour se diviser, tandis qu'une nouvelle rupture d'équilibre entraine une légère rotation de l'ensemble de l'oeuf". De delingsactiviteit wordt door Cassini (1962) aangeduid als "activité pulsatile".

In een zeer uitgebreide studie van Donahue (1972) werden met twee-uurs intervallen 2-36 uur na het toedienen van de HCG - injectie, welke na een voorgaande PMS - injectie superovulatie induceerde, eicellen geïsoleerd uit bevruchte CFL - vrouwtjes. Uit de gemaakte preparaten blijkt het tweecellig stadium, circa 20,5 uur na bevruchting, bereikt te zijn. Dit is 5 uur later dan het hier gevonden tijdstip.

### Blastocystvorming

Bij de diploïde parthenogenonten werden bij de twee embryo's (foto 36) die het blastocyststadium bereikten (tabel VIII - IV) respectievelijk krimpshokken waargenomen op 117, 133,5 en 139,25 en om 96,5, 105, 106,75, 108,5, 119,5 (2x), 129,25 en 139 uur na aktivatie. De volume - afname welke een gevolg is van een krimpshok varieert sterk in grootte en tijd. De eerste drie schokken hadden een geringe volume - afname tot gevolg en waren enkelvoudig, terwijl tussentijds de blastocyst het oorspronkelijke volume weer herkeeg. De vierde schok gebeurde echter tijdens de "herstelperiode", dus tijdens de geleidelijke toename naar het oude volume. Daarna vonden samengestelde krimpshokken plaats welke zich manifesteerden met tussenpozen van slechts enige minuten. Ook de enkelvoudige krimpshokken kwamen nog voor.

Het geleidelijk expanderen en plotseling ineenschrompelen van de blastocyst is reeds door Lewis en Gregory in 1929 bij de bestudering van konijne - blastocyst ontdekt. Kuhl en Friedrich - Freksa (1936) en Kuhl (1941) vonden dit verschijnsel eveneens bij muizeblastocysten. Nog later werd het bevestigd door Borghese en Cassini (1963) en door Cole en Paul (1965). Ook Mulnard (1967) maakt melding van een "pulsation du blastocyst", een eerste contractie werd 109 uur na de bevruchting waargenomen, 3 uur later nogmaals, terwijl tijdens de daarop volgende 12 uren de blastocyst zijn oorspronkelijke volume weer innam. Cole en Paul (1965) suggereerden een werkelijke ("activité pulsatile") "kloppende aktiviteit" bij ratte - blastocysten.

Cole (1967) neemt snelle krimpschokken waar (4–5 minuten) welke door langzamere volumetoename (2–3 uur) weer ongedaan gemaakt werden. Cole concludeert dat het uit de zona pellucida treden van de blastocyst het resultaat is van specifieke cellulaire activiteit en niet een gevolg is van niet – specifieke breuk als gevolg van toenemende druk in de blastocoel. De zona pellucida zou weinig elastisch zijn. Deze waarnemingen zijn in overeenstemming met die van Borghese en Cassini (1963). Zij nemen zeer abrupte krimpschokken waar, 15 seconden – 5 minuten De periode waarin het oorspronkelijke volume weer wordt bereikt varieert van 1h28' tot 5h30'. Een fysiologische betekenis heeft men nog niet gevonden voor deze volumeveranderingen. Wel gaat men er vanuit dat het geen abnormaal fenomeen is (Lewis & Gregory, 1929; Borghese & Cassini, 1963).

### VIII – 5 Concluesies

De ontwikkelingsnelheden van in vivo en in vitro bevruchte embryo's en die van drie typen parthenogenonten (haploïde parthenogenonten, type 2pb1pn en type i.c. en diploïde parthenogenonten type 1pn of 2pn) werden berekend aan de hand van filmbeelden van vertraagde microscopische opnamen. Er bleken de volgende significante verschillen te zijn:

het 2 – cellig stadium wordt door de in vivo bevruchte embryo's sneller bereikt dan door de in vitro bevruchte embryo's en dan door de drie typen parthenogenonten. Bij deze vergelijking werden embryo's en parthenogenonten betrokken die zich tenminste tot het 4 – cellig stadium ontwikkelden.

het 4 – cellig stadium wordt door de in vivo bevruchte embryo's sneller bereikt dan door de in vitro bevruchte embryo's, de diploïde parthenogenonten en de haploïde parthenogenonten type i.c. Bij deze vergelijking werden embryo's en parthenogenonten betrokken die zich tenminste tot het 8 – cellig stadium ontwikkelden. Hierdoor was een vergelijking met de haploïde parthenogenonten type 2pb1pn niet mogelijk.

het 8 – cellig stadium werd door in vivo bevruchte embryo's sneller bereikt dan door de in vitro bevruchte embryo's en de diploïde parthenogenonten. Het werd even snel bereikt door de haploïde parthenogenonten type i.c.

het 2 – en 4 – cellig stadium werd (uiteraard) door de haploïde parthenogenonten type i.c. sneller bereikt dan door de in vivo bevruchte embryo's, ongeacht het feit of de beide vergeleken groepen zich tenminste tot het respectievelijk 4 – of 8 – cellig stadium ontwikkelden of tot het 8 – of 16 – cellig stadium.

Ten aanzien van het mogelijk verband tussen het sneller bereiken van 2 – , 4 – of

8 – cellig stadium en het meer of minder ver ontwikkelde eindstadium bleken de volgende significante verschillen op te treden:

bij de in vivo bevruchte embryo's was er geen verband tussen het gemiddelde tijdstip waarop het 2 – cellig stadium werd bereikt door embryo's die zich niet voorbij het 7 – cellig stadium ontwikkelden en embryo's die tenminste het 8 – cellig stadium bereikten. Ook was er geen verband tussen het gemiddelde tijdstip waarop het 2 – , 4 – of 8 – cellig stadium werd bereikt door embryo's die zich tenminste tot het 8 – cellig, doch niet voorbij het morula – stadium ontwikkelden en embryo's die zich tenminste tot blastocyst ontwikkelden.

bij de haploïde parthenogenonten type 2pb1pn werd het 2 – cellig stadium even snel bereikt door parthenogenonten die zich niet voorbij het 3 – cellig stadium ontwikkelden als door parthenogenonten die zich tenminste tot het 4 – cellig stadium ontwikkelden.

bij de haploïde parthenogenonten type i.c. werd het 2 – cellig stadium significant later bereikt door parthenogenonten die zich niet voorbij het 8 – cellig stadium ontwikkelden ten opzichte van parthenogenonten die zich tenminste tot het 9 – cellig stadium ontwikkelden. Het 4 – en 8 – cellig stadium werd echter evensnel bereikt door parthenogenonten die zich niet voorbij het 12 – cellig stadium ontwikkelden en parthenogenonten die zich tenminste tot het 16 – cellig stadium ontwikkelden.

bij de diploïde parthenogenonten type 1pn of 2pn werd het 2 – cellig stadium even snel bereikt door parthenogenonten die zich niet voorbij het 8 – cellig stadium ontwikkelden als door parthenogenonten die zich tenminste tot het 16 – cellig stadium ontwikkelden. Het 4 – , en 8 – cellig stadium werd echter sneller bereikt door de groepen parthenogenonten die een verder ontwikkeld eindstadium bereiken.

In algemene zin kan men concluderen dat:

- 1) het moment waarop de eerste klievingsdeling optreedt geen indicatie is voor de vitaliteit van het embryo of van de parthenogenont behalve bij de type 2pb1pn parthenogenonten. Onder vitaliteit wordt verstaan het uiteindelijk bereikte eindstadium van de ontwikkeling.
- 2) het tijdstip waarop het 4 – en 8 – cellig stadium bereikt wordt bij in vivo bevruchte embryo's niet maar bij de diploïde en haploïde type i.c. parthenogenonten wel een indicatie is voor de vitaliteit.
- 3) er verschillen zijn in de klievingsdelingen tussen de embryo's en typen parthenogenonten voor wat betreft het optreden van membraancontracties.
- 4) er significante verschillen zijn in het moment waarop bepaalde ontwikkelingsstadia bereikt worden door de in vivo bevruchte embryo's en de in vitro bevruchte embryo's en drie typen parthenogenonten.
- 5) er op schijnbaar willekeurige momenten in het blastocyststadium abrupte "krimpschokken" optreden die gevolgd worden door een geleidelijk herstel naar het oude volume van de blastocoel.

## GERAADPLEEGDE LITERATUUR

- ABRAMCZUK, J., ROWINSKI, J. and SAWICKI, W. (1975) DNA synthesis in the pronuclei of uni cellular embryos and in the parthenogenetically stimulated oocytes of the mouse.  
*Folia Histochem. Cytochem. (Krakow)*, 13, 102.
- ABRAMCZUK, J., and SAWICKI, W. (1975) Pronuclear synthesis of DNA in fertilized and parthenogenetically activated mouse eggs. A cytophotometric study.  
*Exp. Cell Res.*, 92, 361 – 371.
- ABRAMCZUK, J., STARK, R.A., KONWINSKI, M., SOLTER, D., MASTROIANNI, L. and KOPROWSKI, H. (1977) Parthenogenetic activation of rhesus monkey follicular oocytes in vitro.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 42, 115 – 126.
- Advantages of virgin birth. (1970)  
*Nature*, 226, 107.
- AMOROSO, E.C. (1959) The attachment cone of the guinea – pig blastocyst as observed under time – lapse phase – contrast cinematography.  
*Mem. Soc. Endocrinol.*, 6, 50 – 53.
- AMOROSO, E.C., GRIFFITHS, W.F.B., and HAMILTON, W.J. (1942) The early development of the goat, *Capra hircus*.  
*J. Anat.*, 76, 377 – 406.
- ANDERSON, E., HOPPE, P.C., WHITTEN, W.K. and LEE, G.S. (1975) In vitro fertilization and early embryogenesis: a cytological analysis.  
*J. Ultrastruct. Res.*, 50, 231 – 252.
- AUSTIN, C.R. (1951) Activation and the correlation between male and female elements in fertilization.  
*Nature*, 44, 100 – 102.
- AUSTIN, C.R. (1956) Activation of eggs by hypothermia in rats and hamsters.  
*J. Exp. Biol.*, 33, 338 – 347.
- AUSTIN, C.R. (1961) The Mammalian Egg.  
Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- AUSTIN, C.R. (1963) Fertilization and transport of the ovum.  
In: C.G. Hartman, (Ed), Mechanisms concerned with conception.  
Pergamon Press, Oxford.
- AUSTIN, C.R. (1964) Behaviour of spermatozoa in the female genital tract and in fertilization.  
*Proc. Fifth Int. Congress Anim. Reprod. Artificial Insemination*, 3, 7 – 22.
- AUSTIN, C.R. (1965) Fertilization.  
Prentice – Hall Inc., New Jersey.
- AUSTIN, C.R. (1969) Variations and anomalies in fertilization.  
In: C.B. Metz and A. Monroy, (Eds), Fertilization, Comparative Morphology, Biochemistry and Immunology, Vol. II, 437 – 466. Academic Press, New York.
- AUSTIN, C.R. (1972) Fertilization.  
In: C.R. Austin and R.V. Short, (Eds), Reproduction in Mammals. I. Germ cells and fertilization, 103 – 133. Cambridge University Press.
- AUSTIN, C.R. (1974) Fertilization.  
In: C.R. Austin & J.R. Whittaker (Eds), Concepts of development, 48 – 75, Sinauer Assoc. Inc., Stamford, U.S.A.
- AUSTIN, C.R. (1978) Patterns in metazoan fertilization.  
*Curr. Top. Dev. Biol.*, 12, 1 – 9.
- AUSTIN, C.R., and BRADEN, A.W.H. (1952) Passage of the sperm and the penetration of the egg in mammals.  
*Nature*, 170, 919 – 921.
- AUSTIN, C.R., and BRADEN, A.W.H. (1954 – A) Induction and inhibition of the second polar body division in the rat egg and subsequent fertilization.  
*Austr. J. Biol. Sci.*, 7, 195 – 210.
- AUSTIN, C.R., and BRADEN, A.W.H. (1954 – B) Nucleus formation and cleavage induced in unfertilized rat eggs.  
*Nature*, 173, 999 – 1000.
- AUSTIN, C.R., and BRADEN, A.W.H. (1954 – C) Anomalies in rat, mouse and rabbit eggs.  
*Austr. J. Biol. Sci.*, 7, 537 – 544.

- AUSTIN, C.R., and BISHOP, M.W.H. (1957) Preliminaries to fertilization in mammals.  
In: A. Tyler, C.B. Metz, and R.C. von Borstel, (Eds), The beginnings of embryonic development. American Association for the Advancement of Science.
- AZIM, M., SURANI, H., and KAUFMAN, M.H. (1977) Influence of extracellular  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ions on the second meiotic division of mouse oocytes: relevance to obtaining haploid and diploid parthenogenetic embryos.  
*Dev. Biol.*, 59, 86 – 90.
- BAKER, T.G. (1972) Oogenesis and Ovulation.  
In: C.R. Austin and R.V. Short (eds), Reproduction in Mammals, Vol. I: Germ Cells and Fertilization, 14 – 45.
- BALFOUR – LYNN, S. (1956) Parthenogenesis in Human Beings.  
*Lancet* – 1956, 1071 – 1072.
- BALAKIER, H. and TARKOWSKI, H.K. 1976) Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat – shock and Cytochalasin B.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 35, 25 – 39.
- BARANSKA, W., DORYWALSKI, K. and KUJAWA, M. (1973) Succinic dehydrogenase activity in fertilized and unfertilized mouse eggs after parthenogenetic stimulation.  
*Folia Histochem. Cytochem. (Krakow)*, 11, 303 – 304.
- BARROS, C., and YANAGIMACHI, R. (1971) Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material.  
*Nature*, 233, 268 – 269.
- BARROS, C., and YANAGIMACHI, R. (1972) Polyspermy – preventing mechanisms in the golden hamster egg.  
*J. Exp. Zool.*, 180, 251 – 266.
- BATAILLON, E. (1912) La parthenogénese des amphibiens et la fécondation chimique de Loeb. (étude analytique).  
*Ann. Sci. Nat.*, Ser. IX, 249 – 304.
- BAUMGARTNER, A.P., and CHRISTMAN, L.L. (1981 – A) Ovum morphology after hyperthermic stress during meiotic maturation and ovulation in the mouse.  
*J. Reprod. Fertil.*, 61, 91 – 96.

- BAUMGARTNER, A.P., and CHRISTMAN, C.L. (1981 – B) Cytogenetic analysis of ovulated mouse oocytes following hyperthermic stress during meiotic maturation.  
*Exp. Cell Res.*, 132, 359 – 366.
- BEATTY, R.A. (1961) Genetics of mammalian gametes.  
*Anim. Breeding Abstr.*, 29, 243 – 256.
- BEDFORD, J.M. (1968) Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit.  
*Am. J. Anat.*, 123, 329 – 358.
- BEDFORD, J.M. (1972) Sperm transport, capacitation and fertilization.  
In: H. Balin and S. Glasser, (Eds), *Reproductive Biology*, 338 – 392. Excerpta Medica, Amsterdam.
- BICZYSKO, W., SOLTER, D., GRAHAM, C. and KOPROWSKI, H. (1974) Synthesis of endogenous type – A virus particles in parthenogenetically stimulated mouse eggs.  
*J. Natl. Cancer Inst.*, 52, 483 – 489.
- BINGEL, A.S. (1974) Timing of LH release and ovulation in 4 – and 5 – day cyclic mice.  
*J. Reprod. Fertil.*, 40, 315 – 320.
- BLANDAU, R.J. (1969) Gamete transport – comparative aspects.  
In: *The Mammalian Oviduct*, E.S.E. Hafer & R.J. Blandau (Eds), 129 – 162, Univ. of Chicago Press, Chicago.
- BLANDAU, R.J., WHITE, B.J., and RUMERY, R.E. (1963) Observations on the movements of the living primordial germ cells in the mouse.  
*Fertil. Steril.*, 14, 482 – 489.
- BOMSEL – HELMREICH, O. (1965) Heteroploidy and embryonic death.  
In: G.E.W. Wolstenholme, and M. O'Connor, (Eds), *Preimplantation stages of pregnancy*, 246. Ciba Found. Symp., J. and A. Churchill, Ltd., London.
- BORGHESE, E., and CASSINI, A. (1963) Cleavage of mouse egg.  
In: G.G. Rose, (Ed), *Cinemicrography in cell biology*, 263 – 277. Academic Press, New York.
- BORSUK, E. (1982) Preimplantation development of gynogenetic diploid mouse embryos.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 69, 215 – 222.

- BORUM, K. (1961) Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase.  
*Exp. Cell Res.*, 24, 495 – 507.
- BORUM, K. (1966) Oogenesis in the mouse. A study of the origin of mature ova.  
*Exp. Cell Res.*, 45, 39 – 47.
- BOWMAN, P. and McLAREN, A. (1970) Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 24, 203 – 207.
- BRACHET, J. (1957) Biochemical Cytology.  
Academic Press, New York.
- BRACKET, B.G. (1970) In vitro fertilization of rabbit ova: time sequence of events.  
*Fertil. Steril.*, 21, 169 – 176.
- BRADEN, A.W.H. (1953) Distribution of sperms in the genital tract of the female rabbit after coitus.  
*Austr. J. Biol. Sci.*, 6, 693 – 705.
- BRADEN, A.W.H., and AUSTIN, C.R. (1954 – A) The number of sperms about the eggs in mammals and its significance for normal fertilization.  
*Austr. J. Biol. Sci.*, 7, 543 – 551.
- BRADEN, A.W. and AUSTIN, C.R. (1954 – B) Reactions of unfertilized mouse eggs to some experimental stimuli.  
*Exp. Cell Res.*, 7, 277 – 280.
- BRADEN, A.W.H., AUSTIN, C.R., and DAVID, H.A. (1954) The reaction of the zona pellucida to sperm penetration.  
*Austr. J. Biol. Sci.*, 7, 391 – 409.
- BRIDGES, C.B. (1925) Elimination of chromosomes due to a mutant (minute – n) in *Drosophila melanogaster*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 11, 701 – 706.
- BRIGGS, R., and KING, T.J. (1959) Nucleocytoplasmic interactions in eggs and embryos.  
In: Brachet & Minsky (eds), *The Cell. Biochemistry, Physiology, Morphology*. Academic Press, New York, vol. I, 537 – 617.



- BRINSTER, R. (1963) A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst.  
*Exp. Cell Res.*, 32, 205 – 208.
- BRINSTER, R. (1964) Possible energy sources for the development of the early mouse embryo.  
*J. Cell Biol.*, 23, 14A.
- BRINSTER, R. (1965 – A) Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration.  
*J. Exp. Zool.*, 158, 49 – 58.
- BRINSTER, R. (1965 – B) Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of the energy source.  
*J. Exp. Zool.*, 158, 59 – 68.
- BRINSTER, R. (1965 – C) Studies on the development of mouse embryos in vitro. III. The effect of fixed nitrogen source.  
*J. Exp. Zool.*, 158, 69 – 78.
- BRINSTER, R. (1965 – D) Studies of the development of mouse embryos in vitro: energy metabolism.  
In: G. Woltenholme and M. O'Connor (Eds), *Ciba Found. Symp. on preimplantation stages of pregnancy*, 60 – 74. J. and A. Churchill Ltd., London.
- BROWN, K. (1961) Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase.  
*Exp. Cell Res.*, 24, 495 – 507.
- BROWN, K. (1966) Oogenesis in the mouse. A study of the origin of the mature ova.  
*Exp. Cell Res.*, 45, 39 – 47.
- BYSKOV, A.G. (1978) Follicular Atresia  
In: R.E. Jones (Ed), *The Vertebrate Ovary*, 533 – 562, Plenum Press, New York.
- CASSINI, A. (1962) Osservazioni microcinematografiche sulla segmentazione dell'uovo di topo.  
*Monit. Zool. Ital.*, Suppl. vol. 70, 208 – 214.
- CHALMEL, M. – C. (1962) Possibilité de fécondation des oeufs de lapine activés parthénogénétiquement.  
*Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 2, 279 – 297.

- CHAMPLIN, A.K., BEAMER, W.G., CARTER, S.C., SHIRE, J.G.M., and WHITTEN, W.K. (1980) Genetic and social modifications of mating patterns of mice.  
*Biol. Reprod.*, 22, 164 – 172.
- CHANG, M.C. (1952) Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo.  
*J. Exp. Zool.*, 121, 351 – 382.
- CHANG, M.C. (1953) Storage of unfertilized rabbit ova subsequent fertilization and the probability of normal development.  
*Nature*, 172, 352.
- CHANG, M.C., and FERNANDEZ – CANO, L. (1958) Effects of delayed fertilization on the development of pronucleus and the segmentation of hamster ova.  
*Anat. Rec.*, 132, 307 – 322.
- CHANG, M.C., and PINCUS, G. (1951) Physiology of fertilization in mammals.  
*Physiol. Rev.*, 31, 1 – 26.
- CHIQUOINE, D.A. (1954) The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo.  
*Anat. Rec.*, 118, 135 – 145.
- CHOURROUT, D. (1982) La gynogénèse chez les vertébrates.  
*Reprod. Nutr. Dev.*, 22, 713 – 734.
- CONTI, R.G. (1928) Cinematograph demonstration of living tissue cells growing in vitro.  
*Arch. Exp. Zellforsch.*, 6, 86 – 97.
- COLE, R.J. (1967) Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 17, 481 – 490.
- COLE, R.J. and PAUL, J. (1965) Properties of cultural preimplantation mouse and rabbit embryos, and cell strains derived from them.  
In: G. Wolstenholme and M. O'Connor (Eds), Churchill Ltd., London, Ciba Found. Symp. on preimplantation stages of pregnancy, 82 – 112.
- COLLYN D'HOOGHE, M., BRONTY – BOYE, D., MALAISE, E.P., and GRESSER, J. (1977) Interferon and cell division. XII. Prolongation by

interferon of the Intermitotic Time of Mouse Mammary Tumor Cells in vitro. Microcinematographic Analysis.  
*Exp. Cell Res.*, 105, 73 – 77.

COLLYN D'HOOGHE, M. and VALLERON, A – J. (1977) Time – lapse cinematography studies of cell cycle and mitosis duration.  
*Exp. Cell Res.*, 106, 405 – 407.

CONRAD, K., BUCKLEY, J., and STAMBAUGH, R. (1971) Studies on the nature of the block to polyspermy in rabbit ova.  
*J. Reprod. Fertil.*, 27, 133 – 135.

CRONE, M., LEVY, E., and PETERS, H. (1965) The duration of the premeiotic DNA synthesis in mouse oocytes.  
*Exp. Cell Res.*, 39, 678 – 688.

DALCQ, A.M. (1972) An outline occasionally prospective of research concerning experimental parthenogenesis.  
*Cah. Biol.*, 1972, 635 – 646.

DALE, B., and MONROY, A. (1981) How is polyspermy prevented ?  
*Gamete Res.*, 4, 151 – 169.

DAUFORTH, C.H. (1927) A gynandromorph mouse.  
*Anat. Rec.*, 35, 32.

DONAHUE, R.P. (1972) Fertilization of the mouse oocyte. Sequence and Timing of Nuclear Progression to the Two – cell stage.  
*J. Exp. Zool.*, 180, 305 – 318.

DONAHUE, R.P. (1972) Cytogenetic analysis of the first cleavage division in mouse embryos.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 74 – 77.

DVORAK, M. (1961)  
*Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch.*, 45, 1.

DYBAN, A.P., and KHORZHIA, L.J. (1980) Parthenogenetic development of ovulated mouse ova under the influence of ethyl alcohol.  
*Bull. Exp. Biol. Med. USSR*, 89, 528 – 529.

EDWARDS, R.G. (1958) The number of cells and cleavages in haploid, diploid, polyploid, and other heteroploid mouse embryos at 3 – 1/2 days gestation.  
*J. Exp. Zool.*, 138, 189 – 207.

- EDWARDS, R.G. (1977) Earle human development from the oocyte to implantation.  
In: E.E. Philipp, J. Barnes, and M. Newton, (Eds), Scientific foundations of obstetrics and gynecology, 175. Heineman Medical, London.
- EICHER, E.M. (1978) Murine ovarian teratomas and parthenotes as cytogenetic tools.  
*Cytogenet. Cell Genet.*, 20, 232 – 239.
- EPPIG, J.J. (1978) Developmental potential of LT/Sv parthenotes derived from oocytes matured in vivo and in vitro.  
*Dev. Biol.*, 65, 244 – 249.
- EUSEBI, F. and SIRACUSA, G. (1983) An electrophysiological study of parthenogenetic activation in mammalian oocytes.  
*Dev. Biol.*, 96, 386 – 395.
- FEKETE, E. (1937) A case of lateral hermaphroditism in *Mus musculus*.  
*Anat. Rec.*, 69, 151 – 152.
- FLECHON, J. – E., HUNEAU, D., SOLARI, A., and THIBAUT, C. (1975) Réaction corticale et blocage de la polyspermie dans l'oeuf de lapine.  
*Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 15, 9 – 18.
- FORD, C.E., EVANS, E.P., and GARDNER, R.L. (1975) Marker chromosome analysis of two mouse chimaeras.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 33, 447 – 457.
- FRASER, L.R., DANDEKAR, P.V., and GORDON, M.K. (1972) Loss of cortical granules in rabbit eggs exposed to spermatozoa in vitro.  
*J. Reprod. Fertil.*, 29, 203 – 213.
- FROMHOLT, G. (1934) Die Befruchtung und Furchung des Kanincheneies im Film.  
*Zentralbl. Gynaekol.*, 1, 7 – 12.
- FULTON, B.P., and WHITTINGHAM, D.G. (1978) Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium.  
*Nature*, 273, 149 – 151.
- GARNER, W., and McLAREN, A. (1974) Cell distribution in chimaeric mouse embryos before implantation.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 32, 495 – 503.

- GEARHART, J., and OSTER – GRANITE, M.L. (1981) Reproduction in a population of chimeric mice: relationship of chromosomal sex to functional germ cells and proportions of chimeric components in several tissues. *Biol. Reprod.*, 24, 713 – 722.
- GEBAUER, J., and HAUSMANN, I. (1977) Activity of nucleolus organizer region – chromosomes in preimplantation development of normal and parthenogenetic mouse embryos. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 358, 1307.
- GODDARD, M.J., and PRATT, H.P.M. (1983) Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the "2 – cell block". *J. Embryol. Exp. Morph.*, 73, 111 – 133.
- GOLDBARD, S.B., and WARNER, C.M. (1982) Genes affect the timing of early mouse embryo development. *Biol. Reprod.*, 27, 419 – 424.
- GRAHAM, C.F. (1969) Heterospecific Genome Interaction. In: V. Defendi (Ed), *The Wistar Institute Symposium Monograph No. 9*, 19 – 35. The Wistar Inst. Press, Philadelphia.
- GRAHAM, C.F. (1970) Parthenogenetic Mouse Blastocysts. *Nature*, 226, 165 – 167.
- GRAHAM, C.F. (1971) Experimental early parthenogenesis in mammals. *Adv. Biosci.*, 6, 87 – 100.
- GRAHAM, C.F. (1972) Genetic manipulation of the early mouse embryo. *Adv. Biosci.*, 8, 263 – 277.
- GRAHAM, C.F. (1974) The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research. *Biol. Rev.*, 49, 399 – 422.
- GRAHAM, C.F. (1975) The development of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos. *Clin. Genet.*, 8, 387 – 388.
- GRAHAM, C.F. and DEUSSEN, Z.A. (1974) In vitro activation of mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 31, 497 – 512.
- GRAHAM, C.F., McBURNEY, M.W. and ILES, S.A. (1975) Teratomas from haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos.

In: M.J. Sherman and D. Solter (Eds), Teratomas and differentiation.  
Academic Press, New York.

GREGORY, P.W. (1930) Early embryology of rabbit.  
*Contrib. Embryol.*, 21, 141 – 168.

GULYAS, B.J. (1974) Cortical granules in artificially activated  
(parthenogenetic) rabbit eggs.  
*Am. J. Anat.*, 140, 577 – 582.

GULYAS, B.J. (1975 – A) A reexamination of cleavage Patterns in Eutherian  
Mammalian Eggs: Rotation of Blastomere Pair during Second Cleavage in  
the Rabbit.  
*J. Exp. Zool.*, 193, 235 – 248.

GULYAS, B.J. (1975 – B) The dependence of annulate lamellae formation on the  
nucleus in parthenogenetic rabbit eggs.  
*Cell Tissue Res.*, 162, 475 – 481.

GULYAS, B.J. (1976 – A) Early response of mammalian eggs to electrical  
stimulation in vitro.  
*Anat. Rec.*, 184, 418.

GULYAS, B.J. (1976 – B) Ultrastructural observations on rabbit, hamster and  
mouse eggs following electrical stimulation in vitro.  
*Am. J. Anat.*, 147, 203 – 218.

GULYAS, B.J. (1980) Cortical granules of mammalian eggs.  
*Int. Rev. Cytol.*, 63, 357 – 392.

GWATKIN, R.B.L. (1973) The zona reaction of hamster and mouse eggs:  
production in vitro by a trypsin – like protease from cortical granules.  
*J. Reprod. Fertil.*, 32, 259 – 265.

GWATKIN, R.B.L. (1976) Fertilization  
In: G. Poste, and G.L. Nicolson, (Eds), The cell surface in Animal  
Embryogenesis and Development, 1 – 54. Elsevier/North – Holland  
Biomedical Press, Amsterdam

GWATKIN, R.B.L. (1977 – A) Fertilization Mechanisms in Man and Mammals.  
Plenum Press, New York, p.27.

GWATKIN, R.B.L. (1977) Parthenogenesis.

In: Fertilization mechanisms in man and mammals, 115–119. Plenum Press, New York.

GWATKIN, R.B.L., WILLIAMS, D.T., HARTMAN, J.F., and KNIAZUK, M. (1973) The zona reaction of hamster and mouse eggs: Production in vitro by a trypsin – like protease from cortical granules.  
*J. Reprod. Fertil.*, 32, 259 – 265.

GWATKIN, R.B.L., RASMUSSEN, G.H. and WILLIAMS, D.T. (1975) Induction of the cortical reaction of hamster eggs by agents which modify membrane structure.  
*J. Cell Biol.*, 67, 299.

HADEK, R. (1969) Mammalian Fertilization. An atlas of ultrastructure, 295 p. Academic Press, New York.

HAUSMANN, I., GEBAUER, J., and GRIMM, T. (1978) Impaired gene activity for 18S and 28S rRNA in early embryonic development of mouse parthenogenones.  
*Nature*, 272, 377 – 378.

HENTSCHEL, S., and HAUSMANN, I. (1980) The differentiation of cultured parthenogenetic embryos.  
*Eur. J. Cell Res.*, 22, 435, abstract D 1296.

HOLLANDER, W.F., GOWEN, J.W., and STADLER, J. (1956) A study of 25 gynandromorph mice of the Bagg albino strain.  
*Anat. Rec.*, 124, 223 – 239.

HOPPE, P.C. and ILLMENSEE, K. (1977) Microsurgically produced homozygous – diploid uniparental mice.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 5657 – 5661.

HOPPE, P.C. and ILLMENSEE, K. (1982) Full – term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 1912 – 1916.

HOPPE, P.C. and PITTS, S. (1973) Fertilization in Vitro and Development of Mouse Ova.  
*Biol. Reprod.*, 8, 420 – 426.

ILES, S.A., McBURNEY, M.W., BRAMWELL, S.R., DEUSSEN, Z.A. and

- GRAHAM, C.F. (1975) Development of parthenogenetic and fertilized mouse embryos in the uterus and in extra uterine sites.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 34, 387 – 405.
- ILLMENSEE, K. (1982) Experimental genetics of the mammalian embryo.  
*J. Cell Physiol.*, (Suppl.), 2, 117 – 129.
- ILLMENSEE, K. and HOPPE, P.C. (1981) Nuclear transplantation in *Mus musculus* : developmental potential of nuclei from preimplantation embryos.  
*Cell*, 23, 9 – 18.
- JONES, E.C. and KROHN, P.L. (1961) The relationship between age, numbers of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice.  
*J. Endocrinol.*, 21, 469 – 496.
- KAUFMAN, M.H. (1973 – A) Parthenogenesis in the mouse.  
*Nature*, 242, 475 – 476.
- KAUFMAN, M.H. (1973 – B) Timing of the first cleavage division of haploid mouse eggs, and the duration of its component stages: a study of living and fixed eggs.  
*J. Cell Sci.*, 12, 799 – 808.)
- KAUFMAN, M.H. (1973 – C) Timing of the first cleavage division of the mouse and the duration of its component stages: a study of living and fixed eggs.  
*J. Cell Sci.*, 12, 799 – 808.
- KAUFMAN, M.H. (1975 – A) Parthenogenetic activation of mouse oocytes following avertin anaesthesia.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 33, 941 – 946.
- KAUFMAN, M.H. (1975 – B) The experimental induction of parthenogenesis in the mouse.  
In: M. Balls and A.E. Wild (Eds), *The early development of mammals*, 25 – 44. Cambridge University Press, Cambridge.
- KAUFMAN, M.H. (1977 – A) Effect of anaesthetic agents on eggs and embryos.  
In: M.H. Johnson (Ed), *Development in Mammals*, Vol. I, 137 – 163. North Holland Publ. Co., Amsterdam.
- KAUFMAN, M.H. (1978 – A) Chromosome analysis of early postimplantation presumptive haploid parthenogenetic mouse embryos.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 45, 85 – 91.



- KAUFMAN, M.H. (1978-B) The experimental production of mammalian parthenogenetic embryos.  
In: J.C. Daniel, jr., (Ed), *Methods in Mammalian Reproduction*, 21 – 47. Academic Press, New York.
- KAUFMAN, M.H. (1978-C) Bibliography (with review) on mammalian parthenogenetic development.  
*Bibliography Reprod.*, 33, 261 – 264 and 341 – 343.
- KAUFMAN, M.H. (1982-A) The chromosome complement of single single – pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 71, 139 – 154.
- KAUFMAN, M.H. (1982) Two examples of monoamniotic monozygotic twinning in diploid parthenogenetic mouse embryos.  
*J. Exp. Zool.*, 224, 277 – 282.
- KAUFMAN, M.H. (1983) Ethanol – induced chromosomal abnormalities at conception.  
*Nature*, 302, 258 – 260.
- KAUFMAN, M.H., BARTON, S.C. and SURANI, M.A.H. (1977) Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage.  
*Nature*, 265, 53 – 55.
- KAUFMAN, M.H. and GARDNER, R.L. (1974) Diploid and haploid mouse parthenogenetic development following in vitro activation and embryo transfer.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 31, 635 – 642.
- KAUFMAN, M.H., GUC – CUBRILLO, M. and LYON, M.F. (1978) X Chromosome inactivation in diploid parthenogenetic mouse embryos.  
*Nature*, 271, 547 – 549.
- KAUFMAN, M.H., HUBERMAN, E. and SACHS, L. (1975) Genetic control of haploid parthenogenetic development in mammalian embryos.  
*Nature*, 254, 694 – 695.
- KAUFMAN, M.H., ROBERTSON, E.J., HANDYSIDE, A.H. and EVANS, M.J. (1983) Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 73, 249 – 261.

- KAUFMAN, M.H. and SACHS, L. (1975) The early development of haploid and aneuploid parthenogenetic embryos.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 34, 645 – 655.
- KAUFMAN, M.H. and SACHS, I. (1976) Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 35, 179 – 190.
- KAUFMAN, M.H. and STEELE, C.E. (1976) Deleterious effect of an anaesthetic on cultured mammalian embryos.  
*Nature*, 260, 782 – 784.
- KAUFMAN, M.H. and SURANI, M.A.H. (1974) The effect of osmolarity on mouse parthenogenesis.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 31, 513 – 526.
- KLEIN, M. (1955) Unilateral hermaphroditism in the mouse.  
*Anat. Rec.*, 122, 341 – 348.
- KOMAR, A. (1973) Parthenogenetic development of mouse eggs activated by heat – shock.  
*J. Reprod. Fertil.*, 35, 433 – 443.
- KOMAR, A. (1982) Fertilization of parthenogenetically activated mouse eggs. I. Behaviour of sperm nuclei in the cytoplasm of parthenogenetically activated eggs.  
*Exp. Cell Res.*, 139, 361 – 367.
- KRARUP, T., PEDERSEN, T., and FABER, M. (1969) Regulation of oocyte growth in the mouse ovary.  
*Nature*, 224, 187 – 188.
- KRZANOWSKA, H. (1962) Sperm quantity and quality in inbred lines of mice and their crosses.  
*Acta Biol. Cracov. Ser. Zool.*, 5, 279 – 290.
- KUHL, G. (1939) Die Frühentwicklung des Säugetiereies.  
Die Umschau, Heft 4.
- KUHL, W. (1932) Ein neuer Zeitraffer – apparat für aufnahmen mikroskopischer objecte auf normalkinofilm.  
*Z. Wiss. Mikrosk.*, 49, 108 – 113.

- KUHL, W. (1941) Untersuchungen über die Cytodynamik der Furchung und Frühentwicklung des Eies der weissen Maus.  
*Abh. senckenberg naturforsch. Ges.*, 456, 1 – 17.
- LEE, S. van der and BOOT, L.M. (1956) Spontaneous pseudopregnancy in mice. II.  
*Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.*, 5, 213 – 214.
- LEONOV, B.V., KAMAKHIN, A.P. and DMITRIEVA, L.V. (1972) Microcinematografic investigation of cleavage in mouse embryos in vitro.  
*Sov. J. Dev. Biol.*, 3, 158 – 159.
- LEWIS, W.H. and GREGORY, P.W. (1929) Cinematographs of living developing rabbit – eggs.  
*Science*, 69, 226 – 229.
- LEWIS, W.H. and HARTMAN, C.G. (1931) Three living monkey eggs in cleavage with motion pictures of one.  
*Anat. Rec.*, 48, 53.
- LEWIS, W.H. and HARTMAN, C.G. (1933) Early cleavage stages of the eggs of the monkey (*Macacus rhesus*)  
*Contrib. Embryol.*, 24, 189 – 202.
- LOEB, J. (1900) On the artificial production of normal larvae from the unfertilized eggs of the sea urchin.  
*Am. J. Physiol.*, 3, 434.
- LONGO, F.J. (1974) Ultrastructural analysis of parthenogenetic rabbit eggs.  
*Anat. Rec.*, 178, 404 – 405.
- LONGO, F.J. (1975) Ultrastructural analysis of artificially activated rabbit eggs.  
*J. Exp. Zool.*, 192, 87 – 111.
- LOPATA, A., FONSECA, J.R. and SZEGO, C.M. (1977) Cinemicrographic analysis of cytoplasmic and nuclear events associated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes exposed to LH in vitro.  
*J. Reprod. Fertil.*, 50, 211 – 216.
- MARKERT, C.L. and PETTERS, R.M. (1977) Homozygous mouse embryos produced by microsurgery.  
*J. Exp. Zool.*, 201, 295 – 302.

- McCAW, B.K., et al, (1977) X – chromosome replication in parthenogenetic benign ovarian teratomas.  
*Hum. Genet.*, 38, 253 – 264.
- McCAUGHEY, R.W. and CHANG, M.C. (1971) Chromosome at Prometaphase and Metaphase of the first cleavage in mouse and hamster eggs.  
*J. Exp. Zool.*, 177, 31 – 40.
- McLAREN, A. and BOWMAN, P. (1973) Genetic effects on the timing of early development in the mouse.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 30, 491 – 498.
- MINTZ, B. (1957) Embryological development of primordial germ cells in the mouse: influence of new mutation W.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 5, 396 – 403.
- MINTZ, B. (1959) Continuity of the female germ cell line from embryo to adult.  
*Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 48, 155 – 172.
- MINTZ, B. (1971) Allophenic mice of adult embryo origin.  
In: J.C. Daniel jr., (Ed), *Methods in mammalian embryology*, 186 – 214. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- MINTZ, B. and GEARHART, J.D. (1973) Subnormal zona pellucida change in parthenogenetic mouse embryos.  
*Dev. Biol.*, 31, 178 – 184.
- MIYAMOTO, H. and CHANG, M.C. (1972) Development of mouse eggs fertilized in vitro by epididymal spermatozoa.  
*J. Reprod. Fertil.*, 39, 135 – 137.
- MONROY, A. and MOSCONA, A.A. (1979) *Introductory Concepts in Developmental Biology*. University of Chigago Press, Chigago.
- MORI, A. (1961) The difference in sperm morphology in different strains of mice.  
*Tohoku J. Agric. Res.*, 12, 107 – 118.
- MORICARD, R. (1954) Observations of in vitro fertilization in the rabbit.  
*Nature*, 173, 1140.
- MULNARD, J.G. (1967) Analyse microcinématographique du développement de l'oeuf de Souris du stade II au blastocyst.  
*Arch. Biol. (Liege)*, 78, 107 – 138.

- NARBEL – HOFSTETTER, M. (1964) Protoplasmatologia. Handbuch der protoplasmaforschung. Band VI – F 2: Les altérations de la meiose chez les animeaux parthénogénétiques. Springer – Verlag, Wien.
- NICOSIA, S.V., WOLF, D.P. and INOUE, M. (1977) Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Dev. Biol.*, 57, 56 – 74.
- NIWA, K., ARAKI, M., and IRITANI, A. (1980) Fertilization in vitro of eggs and first cleavage of embryos in different strains of mice. *Biol. Reprod.*, 22, 1155 – 1159.
- NOVAK, J. and EISINGER, K. (1923) Ueber künstlich bewirkte Teilung des unbefruchteten Säugetiereies. *Arch. Mikrosk. Anat.*, 98, 10 – 46.
- PATTERSON, H.L., and ZAMBONI, L. (1976) Cortical granule loss in parthenogenetic ova activated by electric shock. Ninth Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 77, abstract 123.
- PEDERSEN, T. (1970) Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol.*, 64, 304 – 323.
- PESONEN, S. (1950) Tumours resulting from parthenogenesis induced by plant hormones in albino rats. *Acta Endocrinol.*, 5, 409 – 412.
- PETERS, H. (1979) Some aspects of early follicular development. In: Ovarian Follicular Development and Function. Midgley, A. & Sadler, W.A. (Eds), 1 – 14, Raven Press, New York.
- PETZOLDT, U., ILLMENSEE, G.R., BURKI, K., HOPPE, P.C. and ILLMENSEE, K. (1982) Protein synthesis in microsurgically produced androgenetic and gynogenetic mouse embryos. *Mol. Gen. Genet.*, 184, 11 – 16.
- PETZOLDT, U., and HOPPE, P.C. (1980) Spontaneous parthenogenesis in *Mus musculus*: comparison of protein synthesis in parthenogenetic and normal preimplantation embryos. *Mol. Gen. Genet.*, 180, 547 – 552.
- PIKO, L. (1961) La polyspermie chez les animeaux. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 1, 323 – 383.

- PINCUS, G. (1936) The eggs of Mammals, p. 89.  
The MacMillan Company, New York, 89.
- PINCUS, G. (1939 – A) The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. IV. The development of fertilized and artificially activated rabbit eggs.  
*J. Exp. Zool.*, 82, 85 – 130.
- PINCUS, G. (1939 – B) The breeding of some rabbits produced by recipients of artificially activated ova.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 25, 557 – 559.
- PINCUS, G. and ENZMANN (1936) The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. II. The activation of tubal eggs of the rabbit.  
*J. Exp. Zool.*, 73, 195 – 208.
- PINCUS, G. and SHAPIRO (1940) The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. VII. Further studies on the activation of rabbit eggs.  
*Proc. Am. Physiol. Soc.*, 83, 631 – 647.
- PINCUS, G., and WADDINGTON, C.H. (1939) The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. V. The effects of mitosis – inhibiting treatments on normally fertilized pre – cleavage rabbit eggs.  
*J. Hered.*, 30, 515.
- RASTAN, S., KAUFMAN, M.H., HANDYSIDE, A.H. and LYON, M.F. (1980)  
X – chromosome inactivation in extra – embryonic membranes of diploid parthenogenetic mouse embryos demonstrated by differential staining.  
*Nature*, 288, 172 – 173.
- RIDDLE, P.N. (1979) Time – lapse Cinemicroscopy.  
*Biological Techniques Series*, Vol.2, p. 119. Academic Press, London,
- ROBERTSON, E.J., EVANS, M.J. and KAUFMAN, M.H. (1983)  
X – chromosome instability in pluripotential stem cell lines derived from parthenogenetic embryos.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 74, 297 – 309.
- ROSENBERGER, H. (1929) A Standard Microcinematographic Apparatus.  
*Science*, 69, 672 – 674.

- ROTHSCHILD LORD, S.M.M. (1954) Polyspermy.  
*Q. Rev. Biol.*, 29, 332 – 342.
- RUGH. (1976)  
*Clinics Obstet. Gynecol.*, 3, 3.
- RYAN, K.D., and SCHWARTZ, N.B. (1977) Grouped female mice: demonstration of pseudopregnancy.  
*Biol. Reprod.*, 17, 578 – 583.
- SATO, K. (1979) Polyspermy – preventing mechanisms in mouse eggs fertilized in vitro.  
*J. Exp. Zool.*, 210, 353 – 359.
- SATO, K. and BLANDAU, R.J. (1979 – A) Second meiotic division and polar body formation in mouse eggs fertilized in vitro.  
*Gamete Res.*, 2, 283 – 293.
- SATO, K. and BLANDAU, R.J. (1979) Time and process of sperm penetration into cumulus – free mouse eggs fertilized in vitro.  
*Gamete Res.*, 2, 295 – 304.
- SCHUEL, H. (1978) Secretory functions of egg cortical granules in fertilization and development. A critical review.  
*Gamete Res.*, 1, 299 – 382.
- SHARMA, K.N. (1960) Genetics of gametes. IV. The genotype of mouse spermatozoa in four inbred strains and their F1 crosses.  
*Proc. R. Soc. Edinb.*, 68, 54 – 71.
- SHIRE, J.G.M., and WHITTEN, W.K. (1980 – A) Genetic variation in the timing of first cleavage in mice: effect of paternal genotype.  
*Biol. Reprod.*, 23, 363 – 368.
- SHIRE, J.G.M., and WHITTEN, W.K. (1980 – B) Genetic variation in the timing of first cleavage in mice: effect of maternal genotype.  
*Biol. Reprod.*, 23, 369 – 376.
- SIRACUSA, G., WHITTINGHAM, D.G., CODONESU, M. and DE FELICIA, M. (1978) Local anesthetics and phenothiazine tranquilizers induce parthenogenetic activation of the mouse oocyte.  
*Dev. Biol.*, 65, 531 – 535.

- SIRACUSA, G., WHITTINGHAM, D.G., MOLINARO, M. and VIVARELLI, E. (1978) Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 43, 157 – 166.
- SIRLIN, J.L. and EDWARDS, R.G. (1959) Timing of DNA synthesis in ovarian oocyte nuclei and pronuclei of the mouse.  
*Exp. Cell Res.*, 18, 190 – 194.
- SOLTER, D., BICZYNSKO, W., GRAHAM, C.F., PIENKOWSKI, M. and KOPROWSKI, H. (1974) Ultrastructure of early development of mouse parthenogenones.  
*J. Exp. Zool.*, 188, 1 – 24.
- SORENSEN, R.A. (1973) Cinemicrography of mouse oocyte maturation utilizing Nomarski differential – interference microscopy.  
*Am. J. Anat.*, 136, 265 – 276.
- SPURWAY, H. (1955)  
*Lancet*, 1955 II, 967.
- SPURWAY, H. (1955)  
*New Statesman and Nation*, Nov. 19, 1955, 651.
- STEINHARDT, R.A. and EPEL, D. (1974) Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1915 – 1919.
- STEINHARDT, R.A., EPEL, D., CARROLL, E.J. and YANAGIMACHI, R. (1974) Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs?  
*Nature*, 252, 41 – 43.
- STEVENS, L.C. (1975 – A) Comparative development of normal and parthenogenetic mouse embryos, early testicular and ovarian, teratomas, and embryoid bodies.  
In: M.J. Sherman and D. Solter (Eds), *Teratomas and differentiation*, 17 – 32. Academic Press, New York.
- STEVENS, L.C. (1975 – B) Teratocarcinogenesis and spontaneous parthenogenesis in mice.  
*Symp. Soc. Dev. Biol.*, 33, 93 – 106.
- STEVENS, L.C. (1976) Animal model ovarian tumors in inbred strain Lt – Sv Mice.  
*Am. J. Pathol.*, 85, 809 – 811.



- STEVENS, L.C. (1978) Totipotent cells of parthenogenetic origin in a chimaeric mouse.  
*Nature*, 276, 266 – 267.
- STEVENS, L.C. and VARNUM, D.S. (1974) The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs.  
*Dev. Biol.*, 37, 369 – 380.
- STEVENS, L.C., VARNUM, D.S. and EICHER, E.M. (1977) Viable chimaeras produced from normal and parthenogenetic mouse embryos.  
*Nature*, 269, 515 – 517.
- SURANI, M.A.H., BARTON, S.C. and KAUFMAN, M.H. (1977) Development to term of chimaeras between diploid parthenogenetic and fertilised embryos.  
*Nature*, 270, 601 – 603.
- SURANI, M.A.H. and KAUFMAN, M.H. (1977) Influence of extracellular  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ions on the second meiotic division of mouse oocytes and diploid parthenogenetic embryos.  
*Dev. Biol.*, 59, 86 – 90.
- SUZUKI, M.D. (1974) An atlas of mammalian ova, 139 p.  
G. Thieme Publishers, Stuttgart.
- SWANN, M.M. (1957) The control of cell division: a review. I. General mechanisms.  
*Cancer Res.*, 17, 727 – 758.
- SZOLLOSI, D. (1967) Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs.  
*Anat. Rec.*, 159, 431 – 446.
- SZOLLOSI, D. (1971) Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube.  
*Am. J. Anat.*, 130, 209 – 225.
- TARKOWSKI, A.K. (1971) Recent studies on parthenogenesis in the mouse.  
*J. Reprod. Fertil.*, (Suppl.), 14, 31 – 39.
- TARKOWSKI, A.K. (1975 – A) Induced parthenogenesis in the mouse.  
*Symp. Soc. Dev. Biol.*, 33, 107 – 129.

- TARKOWSKI, A.K. (1975 – B) Induced parthenogenesis in the mouse.  
In: C.L. Markert, and J. Papaconstantinou, (Eds), The developmental biology of reproduction, 107 – 129. Academic Press, New York.
- TARKOWSKI, A.K., WITKOWSKA, A. and NOWICKA, J. (1970)  
Experimental parthenogenesis in the mouse.  
*Nature*, 226, 126 – 165.
- TESSLER, S., and OLDS – CLARKE, P. (1981) Male genotype influences sperm transport in female mice.  
*Biol. Reprod.*, 24, 806 – 813.
- THIBAUT, C. (1947 – A) Essai de parthénogenese expérimentale chez le Rat.  
*C.R. Soc. Biol.*, 141, 607 – 608.
- THIBAUT, C. (1947 – B) La parthénogenese expérimentale chez le Lapin.  
*C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 224, 297 – 299.
- THIBAUT, C. (1948) L'activation et la régulation de l'ovocyte parthénogénétique de Lapine.  
*C.R. Soc. Biol.*, 142, 495 – 497.
- THIBAUT, C. (1949) L'oeuf des mammiferes, son développement parthénogénétique.  
*Ann. Sci. Nat. Zool.*, 11, 133 – 219.
- THIBAUT, C. and ORTAVANT, R. (1949) Parthénogenese expérimentale chez la Brebis.  
*C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 228, 510 – 511.
- TROUNSON, A.O., WILLADSEN, S.M. and ROWSON, L.E. (1978)  
Fertilization and developmental capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits and cows.  
*J. Reprod. Fertil.*, 51, 321 – 327.
- UEHARA, T., and YANAGIMACHI, R. (1977) Activation of hamster eggs by pricking.  
*J. Exp. Zool.*, 199, 269 – 275.
- VAN BLERKOM, J. and RUNNER, M.N. (1976) The fine structural development of preimplantation mouse parthenotes.  
*J. Exp. Zool.*, 196, 113 – 124.

- VERMEIDEN, J.P.W. (1974) Voltooiing van de eerste rijpingsdeling in de eicel van de rat.  
Thesis, Erasmus Univ. Rotterdam.
- WASSERMAN, P.M., UKEMA, T.E., JOSEFOWICZ, W.J., LETOURNEAU, G.E., and KARNOVSKY, M.J. (1977). Cytochalasin B – induced pseudocleavage of mouse oocytes in vitro.  
*J. Cell Sci.*, 26, 323 – 337.
- WERTHESEN, H.T. and JOHNSON, R.C. (1974) Pincogenesis – parthenogenesis in rabbits by Gregory Pincus.  
*Perspect. Biol. Med.*, 18, 86 – 93.
- WHITTEN, W.K. (1956 – A) Culture of tubal mouse ova.  
*Nature*, 177, 96.
- WHITTEN, W.K. (1956 – B) Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male.  
*J. Endocrinol.*, 13, 399 – 404.
- WHITTEN, W.K. (1957) Culture of tubal mouse ova.  
*Nature*, 179, 1081 – 1082.
- WHITTEN, W.K. (1971) Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro.  
*Adv. Biosci.*, 6, 129 – 141.
- WHITTEN, W.K. (1971) Parthenogenesis: does it occur spontaneously in mice?  
*Science*, 171, 406 – 407.
- WHITTEN, W.K. and DAGG, C.P. (1961) Influence of spermatozoa on the cleavage rate of mouse eggs.  
*J. Exp. Zool.*, 148, 173 – 178.
- WHITTINGHAM, D.G. (1980) Parthenogenesis in Mammals.  
In: C.A. Finn, (Ed), Oxford Rev. Reprod. Biol., Vol. 2, 205 – 231. Clarendon Press, Oxford.
- WHITTINGHAM, D.G. and SIRACUSA, G. (1976) The role of calcium ions in parthenogenetic activation of mammalian oocytes.  
Ninth Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. Abstract 124, 77.

- WHITTINGHAM, D.G. and SIRACUSA, G. (1978) The involvement of calcium in the activation of mammalian oocytes.  
*Exp. Cell Res.*, 113, 311 – 317.
- WHITTINGHAM, D.G., SIRACUSA, G., and FULTON, B.P. (1978) Ionic activation of the mammalian egg.  
*Biol. Cellulaire*, 32, 149 – 154.
- WITKOWSKA, A. (1973 – A) Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. I. Preimplantation development.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 30, 519 – 545.
- WITKOWSKA, A. (1973 – B) Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. II. Postimplantation development.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 30, 547 – 560.
- WOLF, D.P. and ARMSTRONG, P.B. (1978) Penetration of the zona – free mouse egg by capacitated epididymal sperm: cinemicrographic observations.  
*Gamete Res.*, 1, 39 – 46.
- YAMADA, M., UTSUMI, K., and YUHARA, M. (1978) Production of rat diploid parthenogenones by suppression of extrusion of the second polar body and preimplantation development.  
*Sci. Rep. Fac. Agric.*, Okayama Univ., 51, 39 – 47.
- YANAGIMACHI, R. (1978) Sperm – egg association in mammals.  
*Curr. Top. Dev. Biol.*, 12, 83 – 107.
- YANAGIMACHI, R., and CHANG, M.C. (1961) Fertilizable life of golden hamster ova and their morphological changes at the time of losing fertilizability.  
*J. Exp. Zool.*, 148, 185 – 204.
- ZAMBONI, L. (1971) The morphology of mammalian fertilization.  
Harper and Row publisher, New York.
- ZAMBONI, L., PATTERSON, H. and JONES, M. (1976) Loss of cortical granules in mouse ova activated in vivo by electric shock.  
*Am. J. Anat.*, 147, 95 – 101.
- ZAMPETTI – BOSSELER, F., HUEZ, G. and BRACHET, J. (1973) Effects of several inhibitors of macromolecule synthesis upon maturation of marine invertebrate oocytes.  
*Exp. Cell Res.*, 78, 383 – 393.

ZEILMAKER, G.H. (1973) Fusion of rat and mouse morulae and formation of chimaeric blastocysts.  
*Nature*, 242, 115 – 116.

ZEILMAKER, G.H., VERMEIDEN, J.P.W., VERHAMME, C.M.P.M., and VAN VLIET, A.C.W. (1974) Observations on rat and mouse oocyte maturation in vivo and in vitro: morphology and physiology.  
*Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 4, 15 – 24.

## SAMENVATTING

Dit proefschrift handelt over parthenogenese bij gewervelde dieren. Uit de literatuur blijkt dat het verschijnsel parthenogenese op vele wijzen is gedefinieerd en onderverdeeld in verschillende typen. In **hoofdstuk I** wordt deze diversiteit beschreven en wordt tevens aangetoond dat, als gevolg van nieuw ontwikkelde laboratoriumtechnieken, het onderscheid parthenogenese versus voortplanting met behulp van bevruchting niet meer toereikend is. Er zijn nu experimentele ontwikkelingspatronen mogelijk die op een combinatie van deze twee voortplantingsmechanismen berusten. Om deze onderscheidingsmoeilijkheden op te lossen wordt een nieuwe terminologie en indeling van mogelijke ontwikkelingspatronen bij gewervelde dieren beschreven.

**Hoofdstuk II** bevat een omvangrijke literatuurstudie over het voorkomen van natuurlijke parthenogenese bij gewervelde dieren. Er is naar gestreefd een zo volledig mogelijk beeld te geven omdat enerzijds dit onderwerp over het algemeen weinig bekendheid geniet, terwijl er anderzijds tot op heden geen soortgelijk overzicht in de literatuur is verschenen. De in dit hoofdstuk behandelde literatuur alsmede een aantal referenties waarvan de bibliografische gegevens wel gevonden werden doch waarvan de tekst niet achterhaald kon worden, staan aan het einde van het hoofdstuk vermeld in een aparte bibliografie. De literatuur die aangehaald wordt in verband met het eigen experimentele werk staat aan het einde van het proefschrift vermeld onder het hoofd "geraadpleegde literatuur". Uit de literatuur blijkt dat er verschillende vormen van parthenogenese zijn. Bij alle klassen van de gewervelde dieren treft men bij meerdere diersoorten natuurlijke parthenogenese aan.

Bij vissen zijn drie vormen van natuurlijke parthenogenese beschreven: gynogenese, hybridogenese en ware parthenogenese. (**Hoofdstuk II – 2**) Meestal is er sprake van de eerst genoemde vorm. Behoudens enkele incidentele publikaties over het guppy, (*Lebistes reticulatus*), de zwaarddrager, (*Xiphophorus*), de kopvoorn, (*Leuisiscus cephalus*) en een *Menidia* –soort zijn de waarnemingen verricht aan drie gynogenetische soorten: *Poecilia*, *Poeciliopsis* en *Carassius*.

Bij amfibien is gynogenese aangetoond bij een salamandersoort, *Ambystoma jeffersonianum*, terwijl eveneens bij verschillende vormen van de groene kikker (*Rana esculenta*) parthenogenese werd aangetoond. (**Hoofdstuk II – 3**)

Bij reptielen komt natuurlijke parthenogenese het meest verbreid voor. Het grootste gedeelte van de literatuur valt dan ook binnen deze categorie dieren die verschillende soorten hagedissen, gekko's, leguanen, kameleons en slangen omvat.

( **Hoofdstuk II – 4** ) Hoewel de bewijzen voor het voorkomen van parthenogenese lang niet altijd voorhanden zijn, het is dikwijls een vermoeden op grond van het feit dat men alleen vrouwelijke exemplaren in de natuur heeft aangetroffen, is er met name bij een hagedissoort, *Lacerta saxicola* , onweerlegbaar aangetoond dat er sprake moet zijn van parthenogenese. Tevens is er bij *Lacerta* veel cytologisch onderzoek verricht waarbij behalve de ploïdie ook de vermoedelijke oudersoorten werden bepaald. Het grootste aantal parthenogenetische soorten is bij het genus *Cnemidophorus* beschreven. Ook bij dit genus werd parthenogenese bewezen onder andere met behulp van huidtransplantaten en het eieren leggen door dieren die in strikte afzondering geleefd hebben. De uit deze eieren gekomen dieren legden, eveneens in strikte isolatie, zelf ook weer eieren waaruit levende jongen kwamen.

Bij vogels zijn de waarnemingen beperkt tot kippen en kalkoenen, ( **Hoofdstuk II – 5** ). Reeds in het begin van de vorige eeuw werden bij onbevuchte eieren embryonale ontwikkelingen waargenomen waarbij men zich lang heeft bezig gehouden met de vraag of hier nu sprake was van parthenogenese of niet. Pas ruim een eeuw later komt men tot de overeenstemming dat het hier inderdaad parthenogenese betreft. Dit kwam vooral door de geïntensiveerde belangstelling voor dit onderwerp. Vooral de resultaten van het selectief fokken van kalkoenen, resultaten die uiteindelijk leidden tot het verkrijgen van volwassen kalkoenuikens en later, in 1960, tot volwassen kalkoenen, hebben de laatste twijfels over het ware karakter van bovengenoemde ontwikkelingen weggenomen. Pas in 1973 werden de eerste volwassen parthenogenetisch ontwikkelde kippen beschreven.

Bij zoogdieren ( **Hoofdstuk II – 6** ) en bij de mens zijn tot op heden geen volwassen parthenogenonten beschreven. Bij zoogdieren zijn echter wel vele beschrijvingen van ovaria en oocyten bekend waarbij men parthenogenetische ontwikkelingen veronderstelt. Ook ten aanzien van deze waarnemingen is het echter lang de vraag geweest of er nu sprake was van parthenogenese of van atresie. Een duidelijk onderscheid kan anno 1983 eigenlijk nog steeds niet worden gemaakt. Wel is de laatste decennia duidelijk geworden dat parthenogenese een rol speelt bij het ontstaan van ovariumtumoren. In dit verband is een duidelijke opleving te constateren in het onderzoek naar natuurlijke parthenogenese bij zoogdieren. Dit onderzoek werd mogelijk gemaakt door de ontdekking en de beschrijving in 1974 van een inteelt muizeras met een hoog percentage spontane ovariumtumoren. Ook bij geövuïerde eicellen zijn ontwikkelingen in de eileider beschreven die op parthenogenese lijken. Rond de veertiger jaren raakte men er algemeen van overtuigd dat het hier geen parthenogenese betrof doch normale verouderingsverschijnselen van eicellen.

Ook bij de mens treft men teratomen aan die een parthenogenetische ontstaanswijze bezitten, ( **Hoofdstuk II – 7** ). Dit werd aangetoond met behulp van cytologisch onderzoek aan teratoomcellen waarbij vooral gewerkt werd met specifieke banderingspatronen van chromosomen na speciale kleuringen. Recent is bij de

mens een speciale vorm van parthenogenese, de androgenese, in verband gebracht met een pathologische zwangerschap, de zogenaamde molazwangerschap. De mola's worden in de literatuur onderscheiden in twee verschillende typen: complete en gedeeltelijke mola's. De gedeeltelijke mola's hebben chromosoom - afwijkingen en zijn meestal triploïd terwijl de complete mola's een normaal vrouwelijk karyotype bezitten en, in tegenstelling tot de gedeeltelijke mola's, geen foetus bezitten. Gezien het belang van een tijdige onderkenning van dit type zwangerschap in verband met de gevaarlijke gevolgen die er uit kunnen voortvloeien en het recente karakter van deze onderzoeken en de daaruit volgende beperkte bekendheid, wordt hoofdstuk II - 7 afgesloten met de beschrijving van een aantal belangrijke publikaties op dit gebied.

Het tweede gedeelte van het proefschrift begint met hoofdstuk III waarin een overzicht wordt gegeven van vroege experimenten om parthenogenese langs experimentele weg bij zoogdiereicellen te induceren. Tevens wordt een overzicht gegeven van de verschillende technieken die men hiervoor heeft gebruikt en worden literatuurreferenties gegeven die bij die toegepaste technieken behoren.

Een inleiding tot het eigen werk wordt in hoofdstuk IV gegeven. Er worden enige gegevens over de voortplanting bij het gebruikte proefdier, de laboratoriummuis, gegeven terwijl tevens de materialen en gebruikte methoden worden beschreven. In hoofdstuk III werden de in het eigen onderzoek waargenomen typen parthenogenonten reeds beschreven en schematisch weergegeven. Een van de belangrijke factoren die het type parthenogenont mede bepaalde is de aktivatiemethode die gebruikt wordt.

In het eigen werk is parthenogenese geïnduceerd door incubatie van eicellen in een hyaluronidase - oplossing (hoofdstuk V) en door incubatie in een medium met een niet - fysiologische osmotische waarde (hoofdstuk VI). Bij beide aktivatiemethoden werd met name het effect van twee variabelen onderzocht op de aktivatiefrequentie van de eicellen, op de differentiatie in verschillende typen parthenogenonten en op de verdere ontwikkelingen van deze verschillende typen parthenogenonten in vitro. Deze twee variabelen waren de ouderdom van de eicel (het tijdsinterval tussen de ovulatie en de aktivatie), en de duur van de incubatie in het aktivatiemedium. Tevens werd de invloed van de verschillende osmotische waarden van het incubatiemedium onderzocht (hoofdstuk VI) en het effect van controle - incubaties (hoofdstuk V).

Uit de in Hoofdstuk V uitgevoerde experimenten bleek dat vergelijkbare resultaten werden verkregen uit de hyaluronidase - aktivatie - experimenten en de controle - incubaties. Men kan zich derhalve afvragen of de hyaluronidase werkelijk een bijdrage levert aan de inductie van parthenogenese of dat de explantatieprikkel reeds voldoende is. Wel bleek duidelijk dat men met deze



methode bijna uitsluitend haploïde parthenogenonten type 2pb1pn verkrijgt. Bij eicellen die op een later tijdstip na de ovulatie werden geëxplanteerd werden ook enkele onmiddellijk delende (haploïde) parthenogenonten verkregen terwijl slechts zeer incidenteel een diploïde parthenogenont werd waargenomen. De eicellen die 5 uur tot 7 uur en 15 minuten na ovulatie werden geactiveerd vertoonden een betere verdere in vitro ontwikkeling dan oudere eicellen (aktivatie 9 uur en 15 minuten na ovulatie); het aktivatiepercentage was in de laatste groep echter het hoogste.

In hoofdstuk VI werd parthenogenese geïnduceerd door eicellen in verschillend verdunde kweekmedia te incuberen waardoor zij blootgesteld werden aan milieu's met niet – fysiologische osmotische waarden. De mate van verdunning, met andere woorden de osmotische waarde van het aktivatiemedium, bleek van grote invloed op de verdeling van de typen parthenogenonten die geïnduceerd werden. Er werden overwegend diploïde parthenogenonten verkregen, vooral bij de sterker verdunde media (4/10 – 7/10). De verdere in vitro ontwikkeling in niet – verdund medium werd eveneens bestudeerd. Hieruit bleek dat diploïde parthenogenonten zich beter ontwikkelden. De optimale incubatietijd bleek afhankelijk van de verdunning van het aktivatiemedium. Bij de verdere in – vitro – kweek bleef een groot gedeelte van de parthenogenonten in de verdere ontwikkeling tussen het twee – en het viercellig stadium steken. Wel was duidelijk dat ook nu de diploïde parthenogenonten zich beter ontwikkelden. Na incubatie gedurende 2 uur en 30 minuten in 6/10 medium bleek het hoogste percentage aktivatie verkregen te worden bij eicellen die 6 – 9 uur na ovulatie geactiveerd waren, bij oudere eicellen loopt dit percentage geleidelijk af. Tevens bleek zeer duidelijk dat men bij deze oudere eicellen (13 uur) veel meer "onmiddellijk delende" parthenogenonten verkreeg.

In hoofdstuk VII worden bevruchtingsexperimenten van parthenogenonten beschreven met onder andere het doel na te gaan in hoeverre de parthenogenetische aktivatie ook een aktivatie van het blokkeringsmechanisme van de eicel tegen penetratie door meerdere zaadcellen omvat; de zogenaamde polyspermie blokkade. Daartoe werden parthenogenetisch geactiveerde eicellen alsnog onderworpen aan de mogelijkheid om in vitro bevrucht te worden. De resultaten werden geanalyseerd door chromosoomtellingen en vaststellingen van het aantal gepenetreerde eicellen. Opvallend was de grote invloed die het type parthenogenont uitoefende op deze bevruchtingsmogelijkheid: diploïde parthenogenonten bleken niet bevrucht te kunnen worden, haploïde parthenogenonten wel. Dit duidt op essentiële verschillen in het aktivatieproces van deze beide soorten parthenogenonten. Met een andere aktivatiemethode bleken diploïde parthenogenonten daarentegen ook te bevruchten en wel in dezelfde mate als haploïde parthenogenonten. Hieruit blijkt er er dus tevens een verschil te zijn in aktivatie van dezelfde typen verkregen parthenogenonten als gevolg van verschillende aktivatiemethoden.

In hoofdstuk VIII is de ontwikkeling van parthenogenetisch geactiveerde eicellen bestudeerd en vergeleken met die van normaal bevruchte eicellen. Bij deze studie

werd gebruik gemaakt van vertraagde mikroskopische filmopnamen, de zogenaamde time – lapse microcinematografie. Met deze techniek kunnen zowel de ontwikkelingsnelheden alsmede enige morfologische aspecten geanalyseerd worden. Daartoe werd een serie experimenten uitgevoerd waarbij de ontwikkelingen van in vivo en in vitro bevruchte eicellen vergeleken werden met die van drie verschillende typen parthenogenonten. Met behulp van de vertraagde filmopnamen was het mogelijk de groei exact vast te leggen en desgewenst meerdere keren te heronderzoeken voor onder andere het bepalen van de delingsnelheden. Ook nu bleken er grote verschillen te zijn tussen de drie typen parthenogenonten. Uit de films werden delingstijdstippen bepaald waaruit de celcyclustijden van de eerste drie celgeneraties berekend konden worden. Opvallend was dat de (uiteraard) zeer korte celcyclustijd van de eerste generatie van de onmiddellijk delende parthenogenonten gevolgd werd door een eveneens kortere, ten opzichte van de in vivo bevruchte eicellen, tweede celcyclustijd doch daarna werd gevolgd door een meer dan twee keer zo veel langzamere derde generatietijd. Tevens werd waargenomen dat de celcyclustijd van de eerste generatie diploïde parthenogenonten aanmerkelijk korter was dan die van de haploïde parthenogenonten; beide echter duidelijk langer dan die van in vivo bevruchte eicellen. Ook werd berekend in hoeverre een langzamere groei in het begin van de ontwikkeling gecorreleerd kon worden aan het bereikte eindstadium van die ontwikkeling. Over het algemeen bleek een snellere groei in het begin, dus het sneller bereiken van het twee – en viercellig stadium, gepaard te gaan met het bereiken van een verder ontwikkeld eindstadium, met andere woorden een later afbreken van de verdere ontwikkeling. Met behulp van fotografische afdrucken van de filmnegatieven werden eveneens duidelijke verschillen aangetoond tussen de morfologische ontwikkelingspatronen van de verschillende typen parthenogenonten. Haploïde parthenogenonten, type 2pb1pn, vertoonden sterke membraancontracties voor de eerste celdeling, de diploïde en i.c. – parthenogenonten vertoonden geen contracties bij de eerste celdeling. Bij de tweede celdeling werd dit in enkele cellen van diploïde tweecellige parthenogenonten echter wel waargenomen.

Resumerend kan **geconcludeerd** worden dat er een groot aantal factoren zijn die mede bepalen welk type parthenogenont men verkrijgt na experimentele inducties van parthenogenese bij zoogdiereicellen. Behalve de gebruikte methode, die een zeer grote invloed uitoefent, is ook de constitutie van de eicel zelf van belang waarbij vooral het interval tussen de ovulatie en het uitvoeren van de parthenogenese – inducerende behandeling een rol speelt. De verschillende typen parthenogenonten, waarvan de indeling gebaseerd is op de ontstaanswijze en de ploïdie, verschillen ook ten aanzien van de verdere in vitro ontwikkeling, zowel in snelheid als in het bereikte eindstadium. Ook werd aangetoond dat bij eenzelfde inductiemethode de verschillende typen parthenogenonten op ongelijke wijze reageren ten aanzien van de aktivatie van de zogenaamde polyspermie blokkade.

Tevens bleek dat deze aktivatie van de polyspermie blokkade zowel door de gebruikte parthenogenese inductietechniek alsmede door het verkregen type parthenogenont wordt bepaald.

## SUMMARY

This thesis deals with parthenogenesis in vertebrates. In the literature the phenomenon parthenogenesis is defined in many different ways and classified in different types. This diversion is described in **chapter I** where it is also shown that — due to newly developed laboratory techniques — the distinction between parthenogenesis and reproduction based on fertilization is not sufficient anymore. Nowadays experimental developmental — patterns have been made possible that are based on a combination of these two mechanisms of reproduction. In order to solve these problems of distinction a new terminology is proposed and a classification of possible patterns of development of vertebrates is described.

**Chapter II** contains an extensive study of the literature on the occurrence of natural parthenogenesis in vertebrates. An attempt has been made to present a view as complete as possible because on the one hand — generally speaking — this subject is rather unknown whereas on the other hand no such review has been published until now. The literature reviewed in this chapter — just as some of the references for which the bibliographical data were found but the texts of which could not be obtained — is mentioned at the end of the chapter in a separate bibliography. Literature referred to in connection with the original experimental work itself is mentioned at the end of the thesis under the subject "geraadpleegde literatuur" (consulted literature). It appears from the literature that there are different types of parthenogenesis. Natural parthenogenesis is found in all classes of vertebrates in more than one species.

For the class of fishes three different types of natural parthenogenesis are described: gynogenese, hybridogenese and true parthenogenesis ( **Chapter II-2** ). In most cases the first — mentioned type is involved. Some incidental publications on the guppy, *Lebistes reticulatis* and on *Xiphophorus* , on *Leuisiscus cephalus* and on a *Menidia* — species excepted, observations were carried out on three gynogenetic species: *Poecilia*, *Poeciliopsis* and *Carassius*.

In the class of amphibia gynogenesis was demonstrated in a salamander species, *Ambystoma jeffersonianum*; and it was also shown in different forms of the green frog — *Rana esculenta* — as well ( **Chapter II-3** ).

In the class of reptiles parthenogenesis is spread most widely. Hence most of the literature deals with this class of animals, that includes different species of lizards, geckoes, cameleons and snakes ( **Chapter II-4** ). Although proof of parthenogenesis is hardly ever available — it often is a supposition based on the fact that only female animals were found in nature — it has definitely been proved for *Lacerta*

*saxicola*, a lizard. Much cytological research was done in the case of *Lacerta*: it not only resulted in establishing the ploidy but also provided the most probable parental species. The highest number of parthenogenetic species was described for the genus *Cnemidophorus*. For this genus, too, parthenogenesis has been proved, for example by means of skin grafting and the production of eggs by animals that were raised in strict separation. The animals from these eggs — which were also raised in strict isolation — produced eggs themselves from which living young hatched as well.

For the class of birds the observations were restricted to chickens and turkeys, ( **Chapter II — 5** ). Embryonic development in unfertilized eggs was already observed at the beginning of the last century. During a long period the question was whether these were cases of parthenogenesis or not. Only after more than a century agreement was reached on them being parthenogenetic cases indeed. This was mainly the result of an intensified interest taken in this subject. Especially the results of selective turkey — breeding — results that finally led to the production of mature turkey — chickens — and later on, in 1960, to mature turkeys removed the doubts about the real character of the above — mentioned developments. Only in 1973 the first mature parthenogenetically developed chickens were described.

For the class of mammals ( **Chapter II — 6** ) and for mankind no mature parthenogenones have been described so far. However, many descriptions of mammalian ovaries and oocytes are known in which parthenogenetic development is assumed. About these observations too, it was a long — standing question whether parthenogenesis or atresia was dealt with. At present, in 1983, a clear distinction cannot yet be made. During the last decades it has become clear, however, that parthenogenesis plays a role in the generation of ovarian tumours. In connection with this discovery a definite revival can be seen in the research on natural parthenogenesis in mammals. In 1974 this type of research became possible after the discovery and description of an inbred mouserace with a high percentage of spontaneous ovarian tumours. There are also descriptions of parthenogenesis — like developments in ovulated eggs recovered from the tubae. However, in the forties the conviction grew that it was not parthenogenesis that was dealt with but normal ageing of oocytes.

In mankind too, teratomas can be found that originate parthenogenetically, ( **Chapter II — 7** ). This was proved by cytological research on teratomacells in which the specific banding — patterns of chromosomes after special staining were often used. Recently in man a special type of parthenogenesis — androgenesis — was brought in connection with a pathological pregnancy, the so — called mola — pregnancy. Molas are divided into two different types: complete and incomplete molas. The latter have chromosomal aberrations and are mostly triploid whereas the former have a normal female karyotype, and — in contrast with the incomplete molas — do not possess a foetus. Considering the importance of early detection of this type of pregnancy — in relation with possible dangerous

implications it may have — as well as the recent character of these investigations (for which reason this knowledge is very limited), chapter II — 7 is closed with the description of some important publications in this area.

The second part of the thesis begins with **chapter III** in which a review is given on early experiments with regard to the induction of experimental parthenogenesis in mammalian eggs. An overview of the different techniques that were used and the bibliographical data of the corresponding articles are given as well.

An introduction on the experiments performed is given in **chapter IV**. Some data are given on the reproduction of the animal involved — the laboratory mouse — while the materials and methods are described as well. The types of parthenogenones obtained in the experiments were already described in chapter III where they were also put in a scheme. One of the most important factors that determined the type of parthenogenone was the activation — method used.

In the experiments themselves parthenogenesis was induced by incubating eggs in a hyaluronidase — solution (chapter V) and by incubation in a medium with a non — physiological osmotic value (chapter VI). In both activation — methods special attention was paid to the effect of two variables on the activation — frequency of the eggs: the differentiation in different types of parthenogenones and further development in vitro of these different types of parthenogenones. The two variables were the age of the egg — the time — lag between ovulation and explantation — and the length of the incubation — period in the activation — medium. The influence of the different osmotic values of the incubation — medium was also investigated (chapter VI) as well as the effect of control — incubations (chapter V).

From the results of the experiments in **chapter V** it became clear that comparable results were obtained with the hyaluronidase activation — experiments and the control — incubations. So it can be wondered whether the hyaluronidase really contributes to the induction of parthenogenesis or whether the explantation stimulus itself is sufficient enough. It was quite clear, however, that haploid parthenogenones were obtained almost exclusively with this method: in older eggs some immediate cleavage parthenogenones were obtained while only an incidental diploid parthenogenone was observed. Eggs that were activated between 5 hours and 7 hours and 15 minutes after ovulation, showed a more progressive in vitro development than older eggs (activation 9 hours and 15 minutes after ovulation); however, in this last group the activation percentages were highest.

**Chapter VI** describes parthenogenesis induced by incubating eggs in differently diluted medium as a result of which they were exposed to a milieu with

non – physiological osmotic values. The degree of dilution – – in other words the osmotic value of the activation – medium – – appeared to be of great influence on the distribution of the types of parthenogenones induced. Especially with the stronger diluted media (4/10 – 7/10) mostly diploid parthenogenones were obtained. Further development in vitro in undiluted medium was studied as well. From this it became clear that diploid parthenogenones developed better. The optimum incubation – time appeared to be dependent on the dilution of the activation – medium. A great number of parthenogenones stopped development in vitro between the two – and the four – cellstage. It became clear, however, that this time also the diploid parthenogenones developed better. The highest activation percentage was obtained after incubating eggs which were isolated 6 – 9 hours after ovulation for 2 hours and 30 minutes in 6/10 medium. In older eggs this percentage decreases gradually. It was very clear that much more "immediate – cleavage" parthenogenones were obtained in older eggs (13 hours).

In chapter VII fertilization experiments of parthenogenones are described, for instance, for reasons of checking to what extent the parthenogenetic activation also includes the activation of the blocking mechanism of the egg against penetration by more spermcells, the so – called polyspermy block. For this reason parthenogenetically activated eggs were subjected once again to the possibility of being fertilized in vitro. The results were analyzed by counting the chromosomes and determining the number of penetrated eggs. It was striking that the type of parthenogenone had a great influence on this possibility of fertilization: diploid parthenogenones appeared not to be fertilizable, haploid parthenogenones did. This points to fundamental differences in the activation processes of these two types of parthenogenones. When another activation method was used, however, the diploid parthenogenones appeared to be fertilizable as well, and even more so, in the same order as the haploids. From this there appears to be a difference in activation in the same type of parthenogenone due to the method of activation.

Another way of studying further development of parthenogenetically activated eggs and comparing this with the development of normal fertilized eggs is by means of using film, ( Chapter VIII ). In this way the speed of development as well as some morphological aspects can be analyzed. In order to do so a series of experiments was performed in which a comparison was made between in vivo and in vitro – fertilized eggs and the three types of parthenogenones. These studies were undertaken by using time – lapse micro – cinematography which made it possible to record the development exactly. If desired, the experiment could be re – investigated several times in order to determine the cleavage – rate, for example. Also this time there appeared to be great differences between the three types of parthenogenones. The cleavage – moments were determined by viewing the films and the cell – cycle time of the three first – cell generations could be calculated. It was striking that the (obviously) very short cell – cycle time of the first generation of the immediate – cleavage parthenogenones was followed by an also shorter

second cell – cycle time compared with the *in vivo* fertilized eggs. Yet, later on it was followed by a more than double slow third generation – time. It was also recorded that the cell – cycle time of the first generation of diploid parthenogenones was considerably shorter than that of the haploid ones; both, however, being clearly longer than the *in vivo* fertilized eggs. It was also calculated to what extent a lower growing speed in the beginning of the development could be related to the stage of development that was finally reached. In general, a faster grow in the beginning (quicker reaching the two – and the four – cellstage) appeared to result in reaching a further developed final stage; in other words, a later break down of further development. With photographic prints from the negatives of the films clear differences were demonstrated in the morphological patterns of development of the different types of parthenogenones. Haploid parthenogenones, type 2pb1pn, showed strong contractions of the membrane before the first cell – division; the diploid and immediate – cleavage parthenogenones did not show these at all. In the second cell – division of diploid parthenogenones, however, this was observed occasionally.

After experimental induction of parthenogenesis with mammalian eggs the conclusion can be drawn that there are a great number of factors involved in the process of differentiation into different types of parthenogenones. Not only the method involved is of great influence but the constitution of the egg itself is of importance: especially the interval between ovulation and explantation and the induction of parthenogenesis play a role. The different types of parthenogenones, the classification of which is based on the way it came into being and the ploidy, also differ with respect to further *in vitro* development, in speed as well as in the final stage reached. It was also shown that after using the same method of induction the different types of parthenogenones react in a different way with regard to activation of the so – called polyspermy block. It became clear as well that this activation of the polyspermy block is determined both by the technique of inducing parthenogenesis and by the type of parthenogene obtained.



## CURRICULUM VITAE.

Ingevolge artikel 15 van het promotiereglement van de EUR zoals vastgesteld door het college van dekanen in zijn vergadering van 25 april 1980 volgt hieronder het curriculum vitae van de promovendus.

De schrijver van dit proefschrift werd op 28 april 1945 te Oegstgeest geboren. Na de lagere school in Katwijk aan Zee bezocht te hebben behaalde hij in 1962 het eindexamen H.B.S. – B aan het Rijnlands Lyceum te Wassenaar.

Van 1962 tot 1964 studeerde hij Weg – en Waterbouwkunde aan de Technische Hogeschool te Delft.

In 1964 begon hij met de studie Biologie aan de Rijks Universiteit te Leiden alwaar hij in 1969 het candidaatsexamen (K') behaalde.

Van 1969 tot 1971 vervulde hij zijn militaire dienstplicht. Nadat hij de School Reserve Officieren Artillerie te Breda en de Leger Luchtwaarnemer School te Deelen had bezocht voltooide hij zijn dienstplicht als legerluchtwaarnemer bij het 300 squadron van de Groep Lichte Vliegtuigen op de vliegbasis Deelen.

In 1971 werd de studie biologie hervat en in maart 1974 werd het doctoraalexamen afgelegd. (Hoofdvakken: biochemie bij Prof. Dr. H. Veldstra en Experimentele Plantkunde bij Prof. Dr. W.K.H. Karstens)

Tijdens zijn studie was hij van 1967 tot en met 1972 werkzaam bij Prof. Dr. W.K.H. Karstens als student – assistent op de afdeling Plantenanatomie van het Botanisch Laboratorium.

Vanaf augustus 1974 tot augustus 1978 was hij als wetenschappelijk medewerker verbonden aan de afdeling Endocrinologie, Groei en Voortplanting van de Faculteit der Geneeskunde van de Erasmus Universiteit Rotterdam, alwaar het hiervoor beschreven onderzoek werd verricht.

Van 1977 tot 1979 studeerde hij aan de Faculteit der Letteren van de Universiteit van Amsterdam en volgde daar de post – academiale opleiding tot Wetenschappelijk Bibliothecaris (OWB – B). Deze opleiding werd in 1983 met succes afgerond.

Vanaf augustus 1978 tot juni 1982 was hij werkzaam als hoofd van de Medische Bibliotheek van de Erasmus Universiteit Rotterdam.

Sedert juni 1982 is hij werkzaam bij het Ministerie van Onderwijs en Wetenschappen als directeur van de Centrale directie Documentatie.

Hij is gehuwd en heeft drie zoons.

## LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN EN SYMBOLEN

- A.P. = absolute percentage, dat wil zeggen het percentage dat een bepaald verkregen resultaat vormt ten opzichte van het totale aantal gebruikte eicellen in dat betreffende experiment.
- avertine = tribromoethyl alcohol; verdovingsmiddel.  
(avertin with amylen hydrate; Winthrop Laboratories, Surbiton-upon-Thames, Surrey, England). Deze oplossing werd 1 : 50 verdund met fysiologische zoutoplossing. Voor goed oplossen was verwarming tot 60° C noodzakelijk. In deze verdunding was een intra peritoneale injectie met 0,35 cc voldoende voor een verdoving van ca. 10 minuten.
- chr = chromosomen
- di = diploïd
- F-1 = eerste generatie van een bepaalde kruising.
- fr.pn = gefragmenteerde pronuclei
- h = uur
- ha = haploïd
- HCG = human chorionic gonadotropin
- HP = Hoppe-Pitts medium (Hoppe & Pitts, 1973)
- x/10 HP = verdund HP medium: x volumedelen HP en 10-x volumedelen tridest.
- i.c. = haploïde parthenogenont van het type "immediate cleavage".
- I.E. = internationale eenheid
- k = gezwollen kop van een zaadcel
- n = aantal eicellen of parthenogenonten
- P = overschrijdingskans
- pb = poollichaampje (polar body)
- 2pb1pn = haploïde parthenogenont met een afgesnoerd tweede poollichaampje en een haploïde pronucleus.
- pn = pronucleus
- 1pn = diploïde parthenogenont waarbij de afsnoering van het tweede poollichaampje achterwege is gebleven en de chromosomen zich in één pronucleus bevinden.
- 2pn = diploïde parthenogenont waarbij de afsnoering van het tweede poollichaampje achterwege is gebleven en de chromosomen zich in twee pronuclei bevinden.
- R.P. = relatieve percentage, dat wil zeggen het percentage dat een bepaald verkregen resultaat vormt ten opzichte van een speciale groep (bijvoorbeeld een bepaald type parthenogenont) die gevormd is uit het totale aantal gebruikte eicellen in dat betreffende experiment.
- rpm = aantal omwentelingen per minuut
- s.o = super ovulatie
- ' = minuten, bijvoorbeeld 2h17' = 2 uur en 17 minuten.

## PERSOONLIJK NAWOORD.

Met de publikatie van dit proefschrift is een einde gekomen aan een lange periode van studie, onderzoek en schrijfwerk. De totstandkoming ervan was slechts mogelijk dankzij de steun en hulp van velen. Graag maak ik van deze gelegenheid gebruik een persoonlijk woord aan het proefschrift toe te voegen.

Allereerst wil ik mijn ouders bedanken voor de liberale opvoeding die zij mij gegeven hebben en de gelegenheid die ze mij geboden hebben om twee keer een academische studie te mogen beginnen. Daarvoor hebben zij zich gedurende vele jaren aanzienlijke financiële offers moeten getroosten. Ik ben zeer dankbaar dat U beiden, zoals ik nu mag verwachten, in zo'n goede gezondheid deze promotie zult kunnen meebeleven.

Ook mijn schoonouders wil ik op deze plaats bedanken. U hebt de vorderingen in het voltooien van mijn academische opleiding al vanaf het kandidaats – examen van zeer nabij gevolgd. Uw belangstelling en daadwerkelijke hulp, zowel bij het publiceren van dit proefschrift alsmede op andere terreinen binnen het gezin heb ik steeds als bijzonder ervaren en zeer gewaardeerd.

Vervolgens wil ik graag een aantal personen bedanken die aan het hier beschreven onderzoek hebben meegewerkt.

In de eerste plaats dank ik mijn promotor, Prof. Dr. G.H. Zeilmaker. Beste Gerard, na een moeizame start moest helaas na circa één jaar de oorspronkelijke opzet van het onderzoek, de in vitro bevruchting van humane eicellen, worden verlaten. Zonder mij uit het oog te verliezen heb je mij de eerste tijd veel vrijheid gegeven om op verschillend gebied experimenteel werk te verrichten. Allengs ontwikkelde zich echter een nieuwe lijn in het onderzoek hetgeen leidde tot het onderhavige proefschrift. Onze werkbesprekingen verliepen steeds in een prettige sfeer en werden gekenmerkt door jouw vertrouwen in het eindresultaat. Dit vertrouwen, de vrije hand die je mij gaf en de noodzakelijke bijstellingen zijn bepalend geweest voor het resultaat. Dankbaar ben ik je ook voor het geduld en begrip dat je hebt getoond voor de vertraging die ontstond in de tot standkoming van dit proefschrift als gevolg van bijzondere huiselijke omstandigheden en het twee keer door mij veranderen van baan.

Vervolgens wil ik de beide coreferenten, Prof. Dr. J.F. Jongkind en Prof. Dr. P. Krediet, bedanken voor hun bereidwilligheid als coreferent op te treden. Uw opbouwende, kritische op- en aanmerkingen hebben mij op enkele onduidelijkheden in de oorspronkelijke tekst gewezen waardoor ik deze nog tijdig kon aanpassen. Ik heb het zeer op prijs gesteld dat U dit proefschrift in zo'n korte tijd hebt willen refereren.

Dr. J. Cohen, beste Jaques, het feit dat jij in het kader van je doctoraalstudie biologie te Leiden besloot bij mij in Rotterdam je hoofdvak te doen is voor ons beiden van verstrekkende betekenis gebleken. Je kwam in het laatste jaar van mijn onderzoeksperiode, een jaar waarin "geogst" moest worden, hetgeen het uitvoeren van veel praktisch werk betekende. En juist dat verrichten van het praktische werk was voor mij nagenoeg onmogelijk geworden door een steeds erger wordende allergie voor de proefdieren. De wijze waarop je mij toen geholpen hebt is in kwalitatief en kwantitatief opzicht van groot belang geweest.

Mevrouw C.M.P.M. Rijckmans – Verhamme, beste Camilla, ik heb het steeds als een gelukkige omstandigheid ervaren dat ik in het begin van het onderzoek bij jou op de kamer werd gehuisvest en later op de afdeling je "buurman" heb mogen zijn. Op deze wijze heb ik, vooral in de beginfase van het onderzoek, vaak van jouw grote praktische ervaring kunnen profiteren.

De overige medewerkers van de afdeling dank ik voor de wijze waarop zij mij hebben geholpen, ieder op zijn of haar eigen wijze.

Ook de andere afdelingen van de faculteit die mij op enigerlei wijze hebben geholpen wil ik graag bedanken voor de medewerking die zij mij hebben verleend.

De hulp en de gastvrijheid die ik op de afdeling Anatomie I heb genoten stelden mij in staat ook enig elektronenmikroskopisch onderzoek te verrichten.

De medewerkers van het Audio Visueel Centrum dank ik voor het vele fotografische ontwikkel – en afdrukwerk dat zij voor mij verricht hebben. Ook in de jaren na het onderzoek heb ik nog dikwijls een beroep op hen mogen doen hetgeen onder andere resulteerde in de verfraaiing en definitieve vormgeving van de illustraties in dit proefschrift.

Ook wil ik de medewerkers van het tijdschriftenbureau van de Medische Bibliotheek EUR bedanken voor de wijze waarop zij jarenlang mijn continue stroom van literatuur aanvragen hebben behandeld. Hierdoor werd het mogelijk het hier beschreven literatuuronderzoek uit te voeren en de bijbehorende bibliografie samen te stellen.

Tenslotte dank ik de afdeling Epidemiologie voor de geboden computerfaciliteiten om de tekst van het proefschrift te verwerken en de verleende hulp om het lumozet – programma (min of meer) onder de knie te krijgen.

Op deze plaats wil ik ook Dr. P. Liedholm bedanken voor de ontvangst en de

gastvrijheid die hij mij bereidde tijdens mijn studieverblijf in Malmö op het laboratorium van de vrouwenkliniek, de "kvinnoklinik, Allmänna Sjukhuset, Malmö". Thank you very much Percy for your invitation to visit you in Malmö and the opportunity you offered me to do some research on human oocytes.

Dat het uiteindelijk nog ruim vijf jaar na de beëindiging van het experimentele werk heeft geduurd alvorens dit proefschrift is verschenen ligt in belangrijke mate aan mijzelf. Dat het niet nog langer dan vijf jaar heeft geduurd is voor een groot deel aan anderen te danken. Ook hen wil ik vanaf deze plaats zeer hartelijk bedanken.

Mevrouw A.H. Sepers, beste Jana, het feit dat jij secretaresse van de Medische Bibliotheek werd is voor deze bibliotheek in het algemeen en voor mij persoonlijk in het bijzonder, een gelukkige omstandigheid geweest. Verreweg het grootste gedeelte van het proefschrift is door jou, dikwijls "in de late uren", in de computer ingevoerd. Een van de door mij betreunde konsekwenties van mijn vertrek uit Rotterdam naar Den Haag was dat ik in jou een meer dan voortreffelijke secretaresse verloor die de meest ondoorzichtig geschreven concepten op onnavolgbare wijze in een keurig getikt gedeelte van het proefschrift omtoverde. Als secretaresse en als mens heb ik jou bijzonder gewaardeerd, ik wil je graag bedanken voor het vele werk dat je voor mij hebt gedaan.

Mevrouw M. Meyer, beste Meta, jij hebt de concepten van hoofdstuk II – 1 tot en met II – 6 en hoofdstuk III, bijna een derde van de gehele tekst van dit proefschrift, op voortreffelijke wijze uitgetikt. Jouw spontane aanbod om mij met het tikwerk te helpen na mijn vertrek uit Rotterdam heb ik zeer gewaardeerd. Hierdoor kon een dreigende verdere vertraging in de publikatie van dit boekje worden voorkomen.

De Heer H.T. Wong van het Instituut voor Lexicologie te Leiden dank ik voor het elektronisch inlezen van de hierboven vermelde tekst en het zodanig op computer – tape plaatsen dat ook dit gedeelte van de tekst in de computer van de afdeling Epidemiologie kon worden ingevoerd.

Dat de summary in goed engels is verschenen is niet zozeer de verdienste van de auteur alswel van Mevrouw Drs. S.W. van den Ingh – Partakusuma. Wiana, ik ben blij dat je het "rode potlood" zo driftig in mijn concept hebt gehanteerd, ook jij hartelijk bedankt.

De meest geslaagde bladzijde van dit proefschrift is naar mijn mening de omslag. Zoals zo vaak met proefschriften het geval is, zal het ook bij dit proefschrift ongetwijfeld de meest bekeken bladzijde worden; velen zullen nauwelijks verder komen. Daarom ben ik blij dat ik deze bladzijde niet zelf heb hoeven te maken maar dat Tineke Ouweland – Landheer deze taak op zich heeft willen nemen en op zo'n

korte termijn met deze prachtige illustratie kwam. Ook jou wil ik hartelijk bedanken voor je hulp Tineke.

De uiteidelijke produktie van dit proefschrift is verzorgd door de B.V. Drukkerij en Uitgeverij Korthuis te 's Gravenhage. Dankzij de persoonlijke aandacht die de heer L. Korthuis aan de uitvoering heeft besteed en het zeer flexibel hanteren van overeengekomen "aanleverdata" kon het proefschrift nog tijdig in deze keurig verzorgde vorm gereed komen. Graag wil ik hiervoor jegens de heer Korthuis en zijn medewerkers mijn erkentelijkheid uitspreken.

De Heer en Mevrouw J. Hauttemen te Wavre (België) hebben mij herhaaldelijk een week de gelegenheid gegeven bij hen in alle rust aan het proefschrift te werken. Miep en Jack voor jullie gastvrijheid wil ik jullie graag bedanken, de weken die ik bij jullie door mocht brengen behoren tot mijn meest produktieve ten aanzien van de vorderingen van het proefschrift.

Boukje en Gjerrit Lodewijk, jullie aandeel in het verschijnen van dit boekje is moeilijk met woorden te omschrijven. Jullie vriendschap en daadwerkelijke steun heeft zich tijdens het schrijven van dit proefschrift op een opvallende wijze gemanifesteerd. Nog voordat jullie je nieuwe huis waren ingetrokken hadden jullie mij daar al een "eigen werkkamer" in aangeboden en mij een persoonlijke huissleutel overhandigd. Van dit aanbod heb ik op bijna onbescheiden wijze gebruik gemaakt door gedurende ruim anderhalf jaar nagenoeg iedere zaterdag en zondag bij jullie "in te trekken". Hierdoor werd de voortgang van het schrijfwerk op doorslaggevende wijze beïnvloed. Boukje en Gjerrit, ook jullie wil ik vanaf deze plaats heel hartelijk bedanken, niet alleen voor de aangeboden ideale studeerruimte maar ook voor jullie niet aflatende belangstelling voor de vorderingen van het proefschrift en de honderden koppen koffie en talloze koppen soep, uitsmijters en plakken koek die mij met grote regelmaat op "mijn kamer geserveerd werden" waardoor de vele lange uren korter leken en het werk verlicht werd.

Een proefschrift publiceren is een mijlpaal, niet alleen voor de promovendus maar ook voor zijn direkte omgeving. Hierbinnen bevindt zich ook de belangrijkste persoon die het schrijven van dit proefschrift mogelijk heeft gemaakt. Zij heeft mij herhaaldelijk verzocht niet op deze plaats genoemd te worden omdat zij haar aandeel als een normale en vanzelfsprekende aangelegenheid beschouwde. Ik ben blij dat jij daar al die jaren zo over hebt gedacht Fiet. De reden waarom ik toch gemeend heb jouw verzoek naast mij neer te moeten leggen is het feit dat er op het thuisfront van jou zoveel meer verwacht werd en wordt dan normaal gesproken het geval is. Ik weet dat de afgelopen jaren voor jou mede door dit boekje niet makkelijk zijn geweest en dat jij je vele opofferingen hebt moeten getroosten. Voor je bereidheid daartoe wil ik je toch heel nadrukkelijk op deze plaats bedanken en nogmaals constateren dat dit boekje zonder die bereidheid nooit was verschenen. Alexander en Michiel, bijna wekelijks informeerden jullie "hoeveel bladzijden ik nu

nog moest schrijven” wanneer er weer een weekend verloren was gegaan. Zelfs toen ik, door een te optimistisch verminderen van dat opgegeven aantal, noodgedwongen langdurig op één bladzijde bleef steken bleven jullie vertrouwen op betere tijden. Ik hoop oprecht dat die tijden nu aangebroken zijn en dat ik de vele beloftes die ik jullie de afgelopen jaren heb gedaan tot jullie tevredenheid zal nakomen. Voorlopig staat dit proefschrift en de daarbij behorende promovendus echter nog zwaar bij jullie en bij Wiggert in het krijt!



## COLOFON:

tikwerk	: Jana Sepers, Meta Meyer, Annefiet van Marle en auteur.
uitdraai - zetwerk	: Eindhoven-Druk B.V./Lumozet te Eindhoven.
drukwerk	: B.V. Drukkerij en Uitgeverij Korthuis te 's-Gravenhage.
bindwerk	: Molier Boekbinders B.V.
bladspiegel	: 26 x 37 augustijnen.
letter	: times, corps 9/10.
papier	: Houtvrij halfmat M.C., 90 g/m <sup>2</sup> .
omslag	: 1-zijdig gestreken sulfaatkarton, 300 g/m <sup>2</sup> .
omslag-ontwerp	: Tineke Ouwehand.
foto opnamen	: genummerde foto's: auteur, ongenummerde foto's: zie bronvermelding.
foto productie	: Audio Visueel Centrum, EUR.
illustraties	: ontwerp: auteur. : productie: Audio Visueel Centrum, EUR.





