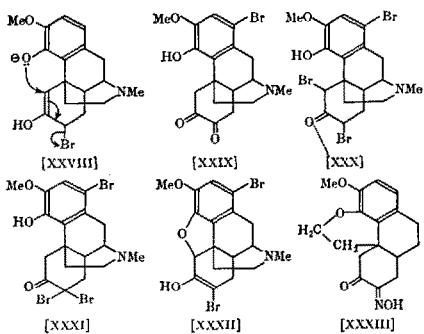


represented as involving bromination at the less hindered position 7, followed by the allylic expulsion of a bromide ion (XXVIII), and indeed there is good evidence that bromination does in fact occur at position 7. SCHÖPF has shown<sup>11</sup> that the treatment of tribromodihydrothebainone with potassium carbonate in methanol affords the antipode of 1-bromosinomeninone (XXIX), and represented this as involving 1:5:7-tribromodihydrothebainone (XXX). Although such  $\alpha\beta$ -dibromocompounds are known in the steroid series a much more reasonable hypothesis in this case is that the diketone (XXIX) arises from the 7:7-dibromo-compound (XXXI); the production of the diketone (XXIX) by the bromination of dihydrocodeinone presumably proceeds through the 7:7-dibromide (XXXI), formed by the 1:4-addition of hydrogen bromide to the allylic ether system of the 7-bromo-enol (XXXII).



Mono-*isonitrosos*thebenone, allotted a 7-*isonitrosos*structure by WIELAND and KOTAKE<sup>12</sup>, was thought by RAPORT and LAVIGNE<sup>13</sup> to be a 5-*isonitroso*-compound, on the grounds that the mechanism of *isonitroso*-compound formation is similar to that of bromination; however the arguments outlined above make the 7-substituted structure (XXXIII) (which is more satisfactory on steric grounds, as reaction would be expected to occur at position 7 rather than at the much more hindered position 5) very much more probable.

K. W. BENTLEY

The Chemistry Department, The University, Aberdeen,  
February 17, 1956.

### Zusammenfassung

Die biologische Entstehung von Thebain und Sinoimin aus zwei enantiomorphen Formen von Laudanin wird zur Diskussion gestellt. Der Schluss der 4,5-Oxyd-Brücke bei 7-Hydroxy-, 7-Amino-, Bromo- und 6-Oximino-Verbindungen verläuft analog dem vorgeschlagenen, biologischen Entstehungsweg. Es wird angenommen, dass die Bromierung der 6-Keto-7:8-dihydro-Verbindungen aus der Morphingruppe in Stellung 7 vor sich geht.

<sup>11</sup> C. SCHÖPF, T. PFEIFFER, and H. HIRSCH, Ann. 492, 213 (1932).

<sup>12</sup> H. WIELAND and M. KOTAKE, Ann. 444, 69 (1925).

<sup>13</sup> H. RAPORT and J. B. LAVIGNE, J. Amer. chem. Soc. 75, 5329 (1953).

### Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pollenschläuchen

Die Selbststerilitätsreaktion äussert sich bei *Petunia* in einer Hemmung des Wachstums der Pollenschläuche im Griffelgewebe. Biochemische Untersuchungen (LINSKENS<sup>1</sup>) zeigten, dass daran Stoffwechselprozesse beteiligt sind. Zur Ergänzung dieser Befunde untersuchten wir die Feinstruktur der Pollenschlauchmembranen im Elektronenmikroskop, um abzuklären, ob bei der Wachstumsemmung auch eine Veränderung der Wandtextur erfolgt.

*Methode.* Für alle Präparate dienten als Griffelspender Pflanzen von *Petunia hybrida media vulgaris* des Klons T<sub>2</sub>U, die die Selbststerilitätsallele S3S3 enthalten. Zur Bestäubung wurden Pollen der gleichen Pflanzen benutzt, also Selbstbestäubung durchgeführt. Die Griffel entfernen wir 12 h nach der Bestäubung und fixierten sie in 1% Osmiumsäure. In den Quer- und Längsschnitten durch diese Griffel gelang es aber nicht, die Pollenschläuche mit Sicherheit von den Leitzellen zu unterscheiden. Die Griffel wurden daher vor dem Einbetten im Methacrylat kurz in 5% NaOH und 5% HCl gekocht, um das Pektin aus den Leitzellen zu entfernen. Wie aus den Abbildungen 4 und 5 hervorgeht, erscheinen dann die Pollenschläuche wegen der starken Kutinisierung kontrastreicher als die dünnen Zellwände der Leitzellen.

Zum Vergleich mit diesem im Griffel gewachsenen Pollenschlauch untersuchten wir auch die Wandtextur von frei gewachsenen Schläuchen. Zu diesem Zwecke liessen wir die Pollen der gleichen *Petunia*-Pflanzen in einer Feuchtkammer auf einer dünnen Schicht Rohrzuckeragar (0,5% Agar, 10% Rohrzucker, 0,01% Borsäure) keimen. Diese Schläuche wurden nach dem Fixieren durch Hydrolyse der Agarschicht mit verd. HCl isoliert und anschliessend abzentrifugiert. Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, dass durch diese Behandlung die nichtzellulösen Wandsubstanzen noch nicht entfernt worden sind. Erst die anschliessende Erwärmung in 10% KOH löste die Inkrusten vollständig heraus (Abb. 2). Zur Untersuchung der Membranstruktur im Elektronenmikroskop wurde ein Tropfen der gewaschenen und angereicherten Pollenschlauchsuspenzion auf den Objekträger übertragen und nach dem Antrocknen mit Chrom beschattet.

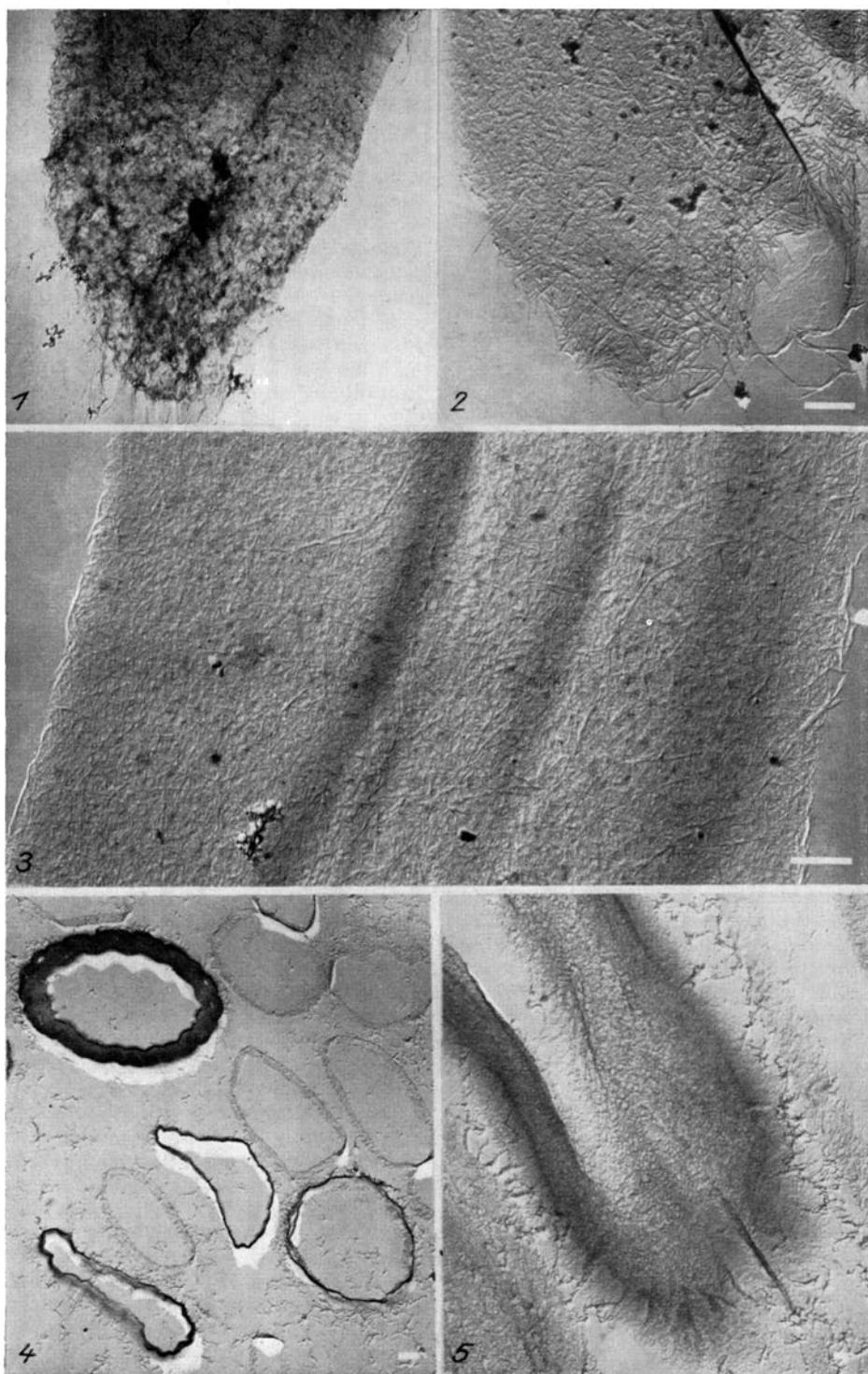
*Ergebnisse.* Nach BIOURGE<sup>2</sup> soll die Pollenschlauchmembran hauptsächlich aus Zellulose bestehen und als Inkrusten Pektin enthalten. Bei den auf Agar gekeimten Schläuchen tritt aber bei der Färbung mit Chlorzinkjod die violette Zellulosereaktion oft erst nach Stunden ein (VOGEL<sup>3</sup>), was darauf hindeutet, dass die Zellulose vollständig durch nichtzellulöse Stoffe maskiert ist. Die Abbildungen 1 und 4 zeigen, dass diese Substanzen bei schwacher Hydrolyse nicht abgebaut werden und daher nicht mit Pektin identisch sind. Solange sich der Schlauch in lebhaftem Wachstum befindet, ist die Spitze weniger stark inkrustiert als der hintere Teil des Schlauches (Abb. 1). Tritt aber ein Wachstumsstillstand ein, so wird auch die Spitze mit jenen Stoffen, die die Eigenschaften von Kutin aufweisen, imprägniert. Dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen von SCHOCHE-BODMER<sup>4</sup>, dass bei wachsenden Schlauchspitzen eine Plasmolyse nicht möglich ist, aber nach einem Wachs-

<sup>1</sup> H. F. LINSKENS, Z. Bot. 43, 1 (1955).

<sup>2</sup> PH. BIOURGE, Cellule 8, 47 (1892).

<sup>3</sup> A. VOGEL, *Die Zellwand der Pollenschläuche*. Diplomarbeit Eidg. Techn. Hochschule, Zürich, 1950.

<sup>4</sup> H. SCHOCHE-BODMER, Ber. schweiz. bot. Ges. 55, 154 (1945); Vjschr. naturf. Ges. Zürich 92, 43 (1947).



1 Spitze eines auf Agar gewachsenen Pollenschlauches. (Vergrösserung 3000:1.) – 2 Pollenschlauchspitze nach dem Weglösen der Inkrusten. (Vergrösserung 7000:1.) – 3 Mittelstück eines Pollenschlauches. (Vergrösserung 9000:1.) – 4 Schnitt durch einen Griffel mit Pollenschläuchen und Leitzellen (Pektin weggelöst). (Vergrösserung 4000:1.) – 5 Längsschnitt durch den Griffel mit Pollenschlauch. (Vergrösserung 3000:1.)

tumstillstand sofort erfolgt. Offenbar zieht sich das Plasma nach der Kutinisierung aus der Zellwand zurück.

Über die Anordnung der Zellulosefibrillen in den Pollenschläuchen ist bereits eine Untersuchung von O'KELLEY und CARR<sup>5</sup> erschienen. Nach diesen Autoren

besteht die Membran im basalen Teil aus einem Fibrillensystem mit Streuungstextur. An der Spitze dagegen fanden sie nur stäbchenförmige Partikel, welche als Bausteine der Zellulosefibrillen angesehen wurden. Eine zusammenhängende Membran soll sich erst hinter der Spitze ausbilden. Nach unseren Ergebnissen (Abb. 2, 3, 5) ist aber kein solcher Unterschied in der Fibrillenstruktur

<sup>5</sup> J. C. O'KELLEY and P. H. CARR, Amer. J. Bot. 41, 261 (1954).

tur vorhanden. Die von O'KELLEY und CARR<sup>5</sup> beobachteten granulären Teilchen sind unseres Erachtens nicht Zellulosepartikel, sondern unvollständig entfernte Inkrusten.

Die an der Spitze sehr dünne Zellulosemembran wird nach hinten durch Anlagerung neuer Stränge verstärkt, wobei aber die ursprüngliche Streuungstextur erhalten bleibt (Abb. 3). Nach SCHOCH-BODMER<sup>4</sup> ist das Flächenwachstum nur auf die ersten 4–7 μ einer Schlauchspitze beschränkt. Eine Umorientierung der Fibrillen erfolgt dann nicht mehr, weil die Membran keine nachträgliche Dehnung erleidet. Vereinzelt fanden wir in den Querschnitten durch die Griffel auch Pollenschläuche mit zweischichtigen Membranen, wobei die innere Lamelle ebenfalls eine Streuungstextur aufwies (Abb. 4). Wie bei den meisten Pflanzenzellen kann auch hier eine nachträgliche Verstärkung der Membran durch eine neue Schicht erfolgen. Bei Zellen mit extremem Spitzewachstum bleibt also die Fähigkeit der Membranbildung nicht nur auf diesen Abschnitt beschränkt. Als weitere Membranbildungen müssen wir auch die Calluspropfen im hinteren Teil der Schläuche ansehen. Eine Innenstruktur dieser Gebilde konnten wir in den Dünnschnitten nicht erkennen; sie erschienen immer homogen.

Vergleichen wir nun die im Griffel gewachsenen Pollenschläuche mit den auf Agar gekeimten, so erkennen wir, dass durch die Wachstumshemmung die Wand dichter geworden ist (Abb. 2, 5). Dieser Befund deutet darauf hin, dass bei gehemmtem Wachstum je Flächeneinheit mehr Fibrillen deponiert werden als in den freiwachsenden Pollenschläuchen. Eine Änderung in der Anordnung der Fibrillen erfolgt dabei nicht, denn die Streuungstextur bleibt immer erhalten.

Im Lichtmikroskop zeigen die Leitzellen des Griffels eine kollenchymartige Struktur. Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4) ersieht man, dass die Zellwand nur aus einer Primärmembran besteht. Typische Kollenchymzellen mit abwechselnden Schichten aus Pektin und Zellulose fehlen ganz. Die kollenchymähnliche Struktur der Leitzellen ist daher nur auf die abnorm stark ausgebildete Mittellamelle zurückzuführen.

K. MÜHLETHALER und H. F. LINSKENS

*Institut für Allgemeine Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule (Laboratorium für Elektronenmikroskopie), Zürich, den 19. März 1956.*

### Summary

Electron micrographs were made of the cellulose part of the cell walls of pollen tubes of *Petunia hybrida*, grown in selfed self-sterile plants and on agar plates. In sterile plants the tubes showed denser membranes but the orientation of the cellulose strands is the same as in cells germinated on agar.

### Electron Microscopy of Thin Sections of Reticulocytes\*

Reticulocytes are young anucleated erythrocytes with a basophilic structure evidenced by vital stainings. This structure has been the subject of study in recent

years<sup>1</sup>, and it is considered to be the result of nucleic acid precipitation during the staining process<sup>2</sup>. BRAUNSTEINER and BERNHARD<sup>3</sup> could not detect filaments in reticulocytes examined in the electron microscope following haemolysis made in suspension in distilled water. Electron microscope studies in this laboratory have, however, shown the existence of filaments inside reticulocytes (Fig. 1 and 2) in blood smears haemolyzed after partial drying, or circular forms when haemolysis was made in suspension in distilled water. Forms that can be considered intermediate between filaments and circular forms were obtained by modifying the haemolysis conditions<sup>4</sup>.

In this communication, evidence is presented that the filaments previously described in haemolyzed reticulocytes also exist in intact reticulocytes and that they have the characteristic mitochondrial structure. This is shown by electron microscopy<sup>5</sup> and is brought out by the staining properties of mitochondria.

To increase the number of reticulocytes in blood, 5–6 ml heart bleedings were made in 350–400 g guinea-pigs, 3 days before preparation. No nucleated erythrocytes were observed in these preparations. The percentage of reticulocytes in red cells was about 8% in both smears for optical microscopy and electron microscope preparations.

Supra-vital staining of reticulocytes as performed with Janus green B showed the filaments and granules in blue-green. Filaments are also to be seen with the dye in smears of these stained cells when these have been haemolyzed after partial drying. Staining of haemolyzed smears was also made according to ALTMANN and REGAUD's methods, by which reticulocytes show the filaments stained in red by fuchsin acid and dark blue by haematoxylin. Hence, the conclusion can be drawn that both supra-vital staining and haemolysis after drying exhibit the same filamentous structure and that these filaments possess an affinity for mitochondrial stains.

Samples for electron microscopy were prepared by suspending red cells of a few drops of blood, immediately after bleeding, in 1% buffered (pH = 7.2–7.4) isotonic osmotic acid solution and fixing for 30 min; dehydration and embedding in a mixture of methyl and butyl methacrylate were carried out according to PALADE<sup>5</sup>. Sections were cut with a Porter-Blum microtome and examined in a Siemens electron microscope UM 100b at 60 kV at 6700 × magnification.

Reticulocyte sections were identified in the electron microscope by the difference from the characteristic aspect of erythrocytes and leucocytes<sup>6</sup>. Erythrocytes are homogeneous and possess great scattering power for electrons due to high haemoglobin content, whereas reticulocytes appear heterogeneous and less dense to electrons (Fig. 3). A continuous transition in appearance can be observed from reticulocytes to adult erythrocytes, which is possibly related to the increase in haemoglobin

<sup>1</sup> M. BESSIS, *Traité de Cytologie Sanguine* (Masson & Cie., Paris 1954), p. 219. — H. BRAUNSTEINER and W. BERNHARD, Acta haematol. 3, 167 (1950).

<sup>2</sup> P. DUSTIN, Jr., *Symposia of the Society for Experimental Biology* 1, 144 (1947). — W. KOSENOW, Acta haematol. 7, 360 (1952).

<sup>3</sup> H. BRAUNSTEINER and W. BERNHARD, Acta haematol. 3, 167 (1950).

<sup>4</sup> A. BRUNNER Jr. and A. VALLEJO-FREIRE, *Exptl. Cell Res.* 10, 55 (1956).

<sup>5</sup> G. E. PALADE, J. Histochem. Cytochem. 1, 188 (1953).

<sup>6</sup> J. KAUTZ and Q. B. DE MARSH, *Blood* 9, 24 (1954); *Symposium sur la Microscopie Electronique des Cellules du Sang par la Méthode des Coupes*, Rev. Hématol. 10, 265 (1955).

\* This study has been aided by a grant from the Conselho Nacional de Pesquisas (Brazil).