

tur vorhanden. Die von O'KELLEY und CARR⁵ 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 SCHÖCH-BODMER⁴ 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 Spitzenwachstum bleibt also die Fähigkeit der Membranbildung nicht nur auf diesen Abschnitt beschränkt. Als weitere Membranbildungen müssen wir auch die Callusprotopfen 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 Wachstumshegung 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

years¹, and it is considered to be the result of nucleic acid precipitation during the staining process². BRAUNSTEINER and BERNHARD³ 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 conditions⁴.

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 microscopy⁵ 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 osmic acid solution and fixing for 30 min; dehydration and embedding in a mixture of methyl and butyl methacrylate were carried out according to PALADE⁵. Sections were cut with a Porter-Blum microtome and examined in a Siemens electron microscope UM 100b at 60 kV at 6700 $\times$ magnification.

Reticulocyte sections were identified in the electron microscope by the difference from the characteristic aspect of erythrocytes and leucocytes⁶. 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

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

² P. DUSTIN, jr., *Symposia of the Society for Experimental Biology* 1, 144 (1947). – W. KOSENOW, *Acta haematol.* 7, 360 (1952).

³ H. BRAUNSTEINER and W. BERNHARD, *Acta haematol.* 3, 167 (1950).

⁴ A. BRUNNER jr. and A. VALLEJO-FREIRE, *Exper. Cell Res.* 10, 55 (1956).

⁵ G. E. PALADE, *J. Histochem. Cytochem.* 1, 188 (1953).

⁶ 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).

content. Inside the reticulocytes are found round, long bodies, which constitute the filaments observed in the haemolyzed smears. All bodies show the characteristic

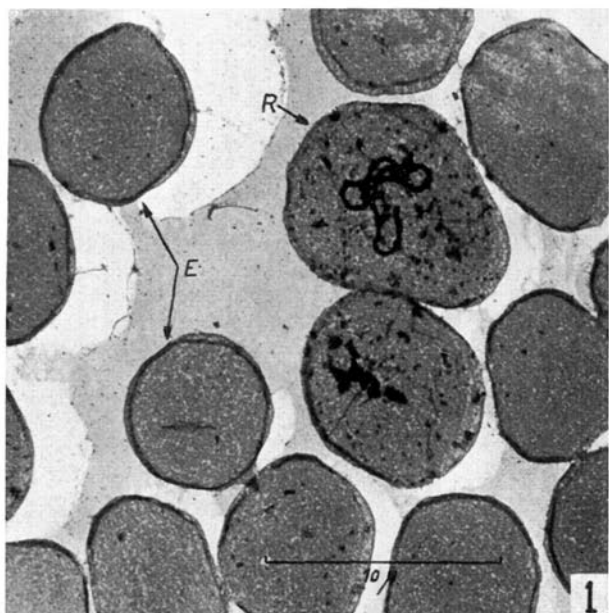


Fig. 1.—Electron micrograph of a smear of reticulocyte *R* and erythrocytes *E*. Haemolysis after partial drying.

mitochondrial structure (Fig. 4), with a limiting membrane and intramitochondrial bands or lamellae⁵; arrow *a* points to a section along the long axis of one of these long bodies, and arrows *b* to inclined cross-sections;

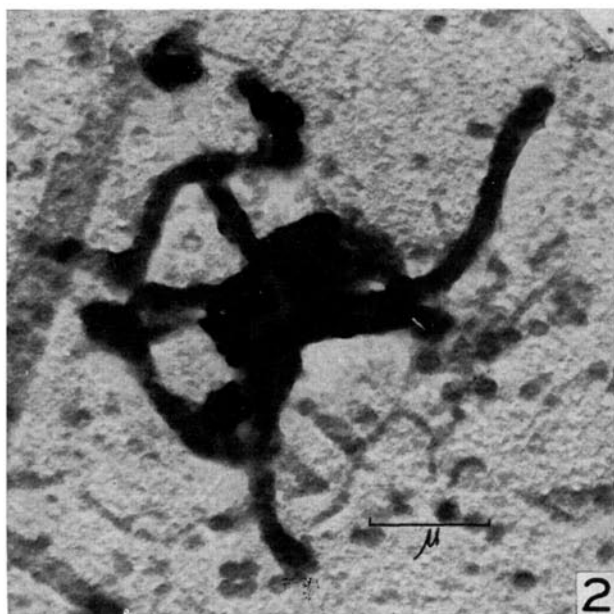


Fig. 2.—Electron micrograph of the filaments inside the reticulocyte. Haemolysis after partial drying. Shaded with chromium, 15°.

arrows *c* point to cross-sections of long or granular mitochondria; arrow *d* points to an elliptical, transparent region observed in many reticulocyte sections, possibly

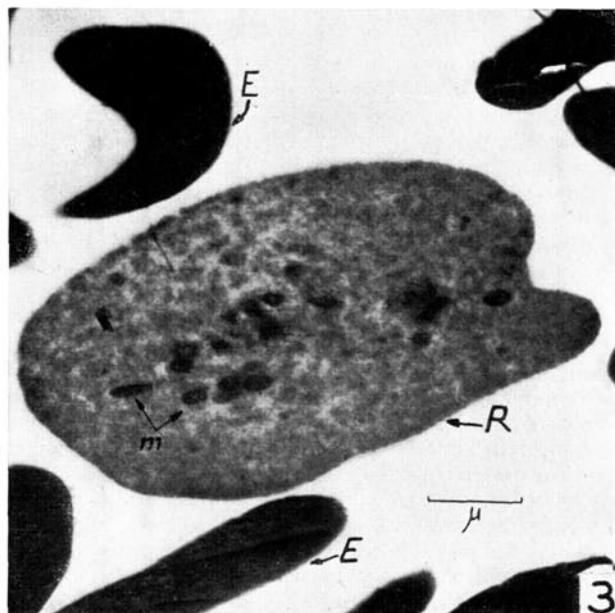


Fig. 3.—Electron micrograph of a thin section of reticulocyte *R* showing mitochondria *m* and erythrocytes *E*. Osmic acid fixation in isotonic medium.

Changes in volume of mitochondria in hypotonic media have been observed by LEWIS and LEWIS⁸ and recently by ZOLLINGER⁹ with the phase-contrast microscope. Special attention has thus been paid to the salt concen-

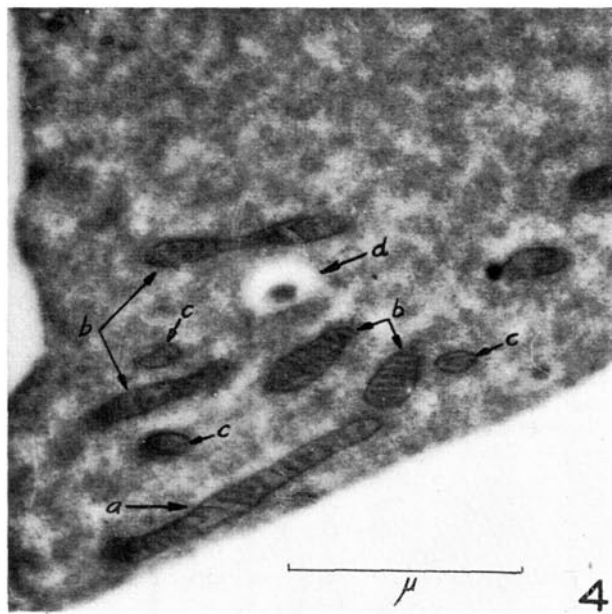


Fig. 4.—Electron micrograph of a thin section of reticulocyte. Arrows *a*, *b* and *c* point to mitochondria; arrow *d* to a vacuole. Osmic acid fixation in isotonic medium.

⁷ M. BESSIS, *Traité de Cytologie Sanguine* (Paris, 1954), p. 219.

⁸ M. R. LEWIS and W. H. LEWIS, *Amer. J. Anat.* 17, 339 (1915).

⁹ H. U. ZOLLINGER, *Amer. J. Path.* 24, 569 (1948).

trations in the fixation medium when preparing reticulocytes for electron microscopy. Figure 5 shows a reticulocyte fixed by formalin in hypotonic medium and stained with phosphotungstic acid, giving evidence of the changes that occur with the mitochondrial filaments in which the internal bands are still discernible, but already show an increase in diameter and in the distance between the mitochondrial bands. These observations on the mitochondrial nature of the filament add further support to the hypothesis, suggested in a previous paper⁴, that the different morphology observed in reticulocytes haemolyzed under various conditions is due to osmotic effects. The aspect of reticulocytes observed by BRAUNSTEINER and BERNHARD³ in electron microscope preparations after haemolysis in distilled water can also be explained by osmotic effects.

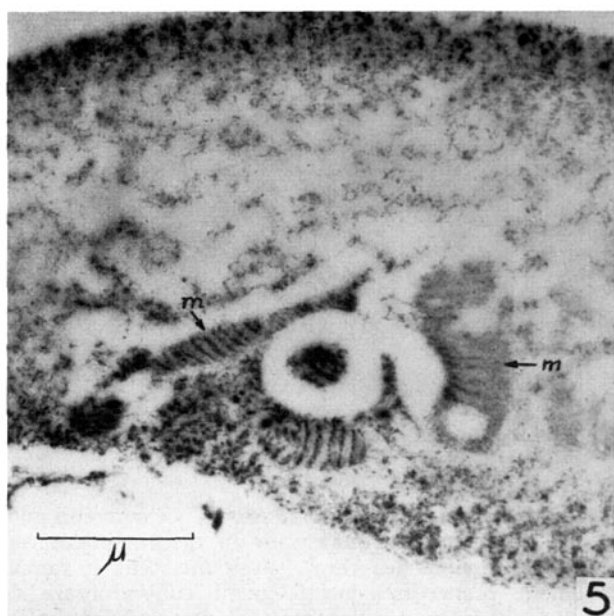


Fig. 5.—Electron micrograph of a thin section of reticulocyte with swollen mitochondria *m*. Formalin fixation in hypotonic medium. Stained with phosphotungstic acid.

From the above observations, it is strongly suggested that the "substantia granulo-filamentosa" in bleeding anaemias is a pre-existent structure inside the reticulocyte and that it is of mitochondrial nature or can originate from mitochondria during the maturation process of the cell.

A. BRUNNER jr., A. VALLEJO-FREIRE,
and P. SOUZA SANTOS

Laboratorio de Virus, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brasil, March 6, 1956.

Zusammenfassung

Retikulozyten von Meerschweinchen, in denen Anämie durch Blutentzug hervorgerufen worden war, wurden in Dünnschnitten elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei wurden dieselben filamentösen Körper mit charakteristischer Mitochondrienstruktur, die auch nach teilweiser Trocknung hämolysierter Ausstriche von Retikulozyten auftreten, gefunden. Diese Filamente formen die durch Vitalfärbung (Janusgrün B) dargestellte innere

Struktur der Retikulozyten und besitzen Affinität zu den spezifischen Mitochondrienfarbstoffen. Auf Grund dieser Feststellungen wird die Natur der «substantia granulo-filamentosa» für mitochondrienartig und somit präexistent gehalten.

Action de la triéthylènemélatamine sur les mitoses de segmentation de l'œuf de *Pleurodèle*

L'action sur la mitose de la 2,4,6-triéthylèneimino 1,3,5-triazine ou triéthylènemélatamine (TEM) a fait l'objet des travaux de BIESELE *et col.*¹, sur des méristèmes radiculaires d'*Allium cepa*, de PLUMMER *et col.*², sur des cultures de fibroblastes de Poulet, de ROSE, HENDRY *et* WALPOLE³, sur le testicule du Rat, et de ROSS⁴, sur *Vicia faba*. MEIER, DESAULLES *et* LOUSTALOT⁵ ont comparé son action inhibitrice sur le développement du granulome expérimental et sur celui de diverses tumeurs du Rat.

Les œufs en segmentation de *Pleurodeles wallii* Michah. ont été traités par des solutions de TEM, échelonnées de $1/400$ à $1/12000$. Ils ont été fixés, après des temps variables, au sublimé-cobalt, inclus au méthyl-salicylate de celloïdine et colorés par la méthode de FLEMING, suivant une technique qui a été exposée ailleurs⁶. Nous résumerons les conclusions tirées de l'examen de plus de 300 œufs, coupés en série.

1° *Agglutination des œufs*. La TEM, aux concentrations de $1/200$ à $1/2000$, produit une forte agglutination des œufs, qui se collent entre eux par leur membrane vitelline. Ce pouvoir agglutinant disparaît dans les solutions vieilles, dont l'action sur les chromosomes persiste, à peine atténuée, et aux concentrations inférieures à $1/4000$.

2° *Action sur le clivage et sur la polarité*. Pendant les premiers cycles de segmentation, la TEM n'inhibe pas la segmentation, même si elle commence à pénétrer dans le cytoplasme aussitôt après la fécondation. Elle ne modifie pas la polarité du fuseau, ni l'aspect des sphères et des asters, sauf cependant dans deux cas: 1° quand elle agit aussitôt après la fécondation et que les œufs sont particulièrement sensibles: on obtient alors des morulas (à 16 blastomères par exemple), qui contiennent seulement 1 ou 2 noyaux, dépourvus de polarité; 2° à la fin de la segmentation, quand la puissance des pôles diminue normalement, ce qui rend le fuseau plus vulnérable. Dans les cas intermédiaires, on peut observer une dissociation entre la segmentation et l'activité des pôles, qui continue, d'une part et la chromatine altérée, qui évolue difficilement, d'autre part, d'où les mitoses pluripolaires (Fig. 1) et parfois la libération de multiples cytasters. La force active des pôles est cependant suffisante pour que des cycles mitotiques successifs se poursuivent jusqu'à la fin de la segmentation.

3° *Action de rupture des chromosomes*. La TEM est essentiellement un agent de rupture des chromosomes dans

¹ J. J. BIESELE, F. S. PHILIPS, J. B. THIERSH, J. H. BURCHENAL, S. M. MUCKLEY *et* C. C. STOCK, *Nature* 166, 1112 (1950).

² J. L. PLUMMER, L. T. WRIGHT, G. ANTIKADJIAN *et* S. WEINTRAUB, *Cancer Res.* 12, 796 (1952).

³ F. L. ROSE, J. A. HENDRY *et* A. L. WALPOLE, *Nature* 165, 993 (1950).

⁴ W. C. J. ROSS, *Nature* 165, 808 (1950).

⁵ R. MEIER, P. A. DESAULLES *et* P. LOUSTALOT, *Exper.* 12, 61 (1956).

⁶ P. SENTEIN, *Arch. Anat. micr.* 43, 80 (1954); sous presse (1956).