

RBK dem Influenzavirus gegenüber¹, das in folgender Weise gedeutet wird: die JO_4 -Ionen oxydieren die Glykolbindungen im Mucin, oder Mucoprotein der RBK nach der von MALAPRADE² beschriebenen Reaktion, wodurch der Mucinasen das Substrat entzogen wird; die spontane Elution des Virus ist daher gehemmt, die RBK bleiben agglutiniert.

Diese Ansicht wurde von mehreren Seiten einer fundamentalen Kritik unterzogen³, und auch BURNET äusserte⁴ auf Grund der an submaxillarem Mucin und an Harnmucin erhaltenen Daten GOTTSCHALKS⁵ jene Meinung, dass der der Virushämagglutination zugrundeliegende biochemische Vorgang nicht einer Mucinasen-, wohl aber einer Amidasewirkung entspricht. Demnach sollte die vom Virus verursachte Veränderung an den zur Zeit ebenfalls hypothetischen Amidbindungen des Substrats entstehen. Ferner sei erwähnt, dass nach neueren Angaben von KLENK *et al.*⁶ das Influenzavirus aus Harnmucin Neuraminsäure freisetzt. Dieselbe Forschergruppe konnte in den Stromata der RBK einiger Tierarten die Anwesenheit von Neuraminsäure nachweisen⁷. Schliesslich wurde auf Grund von serologischen Untersuchungen in Frage gestellt, ob das Substrat der JO_4 -Ionenwirkung überhaupt der Virusrezeptor der RBK ist⁸.

Durch alle diese Angaben wird die Bedeutung der JO_4 -behandelten RBK hinsichtlich der Erklärung der Virushämagglutination bzw. Elution in ein neues Licht gerückt.

Die Richtigkeit der Annahme, dass der Rezeptor der RBK der JO_4 -Oxydation direkt zugängliche Glykolbindungen enthält, deren OH-Gruppen das JO_4 -Ion zu Aldehydgruppen oxydiert, kann unmittelbar experimentell geprüft werden. Nach HOTCHKISS⁹ und McMANUS¹⁰ beruht nämlich der histochemische Nachweis des Mucins eben auf jener JO_4 -Reaktion, auf Grund welcher der Virusrezeptor der RBK für Mucin oder für Mucoprotein gehalten wird. Wenn also die RBK auf ihrer Oberfläche durch JO_4 -Ionen oxydierbare, freie Glykolgruppen enthalten, so müssen diese mit Hilfe des McManusschen Verfahrens nachweisbar sein.

Zu diesem Zwecke wurden sowohl in Alkoholdämpfen fixierte Ausstriche menschlicher, bzw. Schafs-RBK als auch Schnitte von in Paraffin eingebettetem Blutgerinnsel nach der Methode von McMANUS gefärbt, ohne Anwendung einer nachträglichen Kontrastfärbung. Die Präparate wurden 30 min bzw. 24 h lang¹¹ mit einer 0,5%igen KJO_4 -Lösung (die zwecks vollständiger Lösung mit 10%iger HCl angesäuert wurde) behandelt. Zur Kontrolle des Schiffschens Reagenten dienten gleichzeitig hergestellte und in derselben Weise behandelte Schnitte von in Paraffin eingebetteten, neugeborenen

Mäusen mit dem Unterschied, dass bei diesen Präparaten auch die McManussche Acetylierungsreaktion durchgeführt wurde.

Die Farbstoffkontrolle fiel in jedem Falle positiv aus. Gleichzeitig konnte bei der mikroskopischen Untersuchung in den RBK-Präparaten, von der histologischen Bearbeitung und der Zeitdauer der Behandlung unabhängig, keine für Mucin, bzw. Mucoprotein charakteristische, der positiven Schiffreaktion entsprechende karminrote Verfärbung beobachtet werden. Die Farbe der RBK war im allgemeinen blässer als die Farbe der nativen RBK und zeigte einen etwas graulichen Anflug.

Zur Bewertung dieser Angaben möchte ich erwähnen, dass nach meinen später mitzuteilenden, polarographisch ermittelten Daten der Gehalt der durch JO_4 -Ionen oxydierbaren Substanzen in den RBK um mehrere Grössenordnungen höher ist als die histochemisch nachweisbare Menge derselben Substanzen. Die serologische und histochemische Nachweisbarkeit ist dagegen, bekannterweise, von etwa derselben Grössenordnung. Es kann daher mit Recht behauptet werden, dass die RBK und folglich auch der Rezeptor der RBK keine freie Glykol- oder primäre Aminoalkoholgruppen besitzt, die durch JO_4 -Ionen zu Aldehyd oxydierbar sind. Diese Reaktion kann also kaum den chemischen Mechanismus der Veränderungen darstellen, die die JO_4 -behandelten RBK dem Influenzavirus gegenüber aufweisen.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Ungarischen Akademie der Wissenschaften durchgeführt.

Für die technische Mitarbeit spreche ich FRAN ELISABETH VARGA meinen besten Dank aus.

I. SZÉKÁCS

Abteilung für Virusforschung, Staatliches Institut für Volksgesundheitswesen, Budapest (Ungarn), den 10. April 1957.

Summary

The presence of groups directly oxydizable to aldehyde by means of IO_4 -ions could not be proved histochemically in erythrocytes.

Détection cytochimique de l'acide ribonucléique dans les chromosphères pré- et post-méiotiques des sporanges de résistance d'*Allomyces*

Nous avons démontré cytochimiquement (tests ribonucléase, acide perchlorique, etc.) que le corps paranucléaire des gamètes et planozygotes d'*Allomyces* présente une accumulation cytoplasmique d'acide ribonucléique associé à des protéines sulfhydrilées¹. Le corps paranucléaire des zoospores issues des zoosporanges (phase sporophytique du développement) présente les mêmes réactions cytochimiques que les gamètes.

Lors de leurs belles recherches sur la méiose chez *Allomyces*, EMERSON et WILSON² et WILSON³ avaient observé l'apparition de chromosphères transitoires précédant la prophase méiotique et de chromosphères emboîtant les noyaux post-méiotiques dans les sporanges de résistance de ce champignon. Ces chromosphères, de nature inconnue, étaient fortement colorées par l'orcéine acétique.

¹ G. TURIAN, C. r. Acad. Sci. 240, 2343 (1955); Protoplasma 47, 135 (1956).

² R. EMERSON et CH. M. WILSON, Science 110, 86 (1949).

³ CH. M. WILSON, Bull. Torrey Bot. Club 79, 139 (1952).

¹ G. K. HIRST, J. exp. Med. 87, 301 (1948).

² L. MALAPRADE, Bull. Soc. chim. France 43, 683 (1928); 1, 833 (1934).

³ W. F. GOEBEL, P. E. OLITSKY und A. C. SAENZ, J. exp. Med. 87, 445 (1948). – D. J. BAUER, The nature of virus multiplication (Univ. Press, Cambridge 1953), p. 54.

⁴ F. M. BURNET, Dtsch. med. Wschr. 79, 737 (1954).

⁵ A. GOTTSCHALK und P. E. LIND, Nature 164, 232 (1949); 167, 845 (1951); 172, 808 (1953). – A. GOTTSCHALK, Yale J. biol. Med. 26, 352 (1954).

⁶ E. KLENK, H. FAILLARD und H. LEMPFRIED, Hoppe-Seylers Z. 301, 235 (1955).

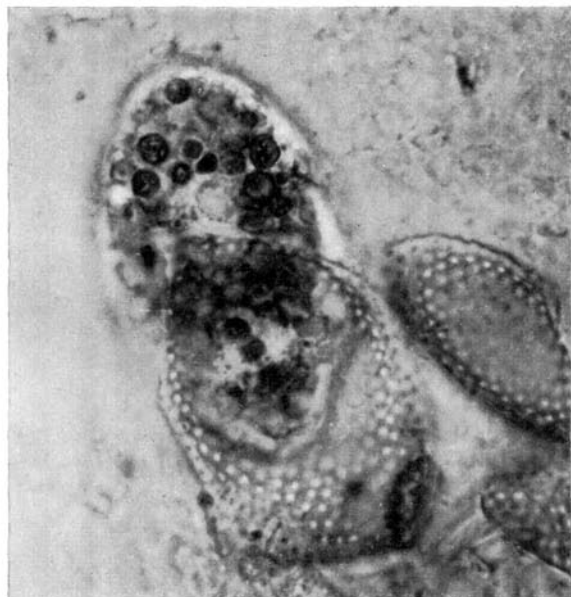
⁷ E. KLENK und H. WOLTER, Hoppe-Seylers Z. 291, 259 (1952). – E. KLENK und W. STOFFEL, Hoppe-Seylers Z. 303, 78 (1956).

⁸ I. SZÉKÁCS, Exper. 13, 108 (1957).

⁹ R. D. HOTCHKISS, Arch. Biochem. 16, 131 (1948).

¹⁰ J. F. A. McMANUS, Nature 158, 202 (1946). – J. F. A. McMANUS und J. E. CASON, J. exp. Med. 91, 651 (1950).

¹¹ J. F. LHOTKA, Nature 171, 1123 (1953).



Chromosphères pré-méiotiques dans les protoplastes de sporanges de résistance immatures d'*Allomyces macrogynus* Em. A droite, préparation témoin, à gauche, préparation traitée à la ribonucléase (1 h à 55°). Coloration au bleu de toluidine acétique. $\times 1250$.

Nous avons retrouvé ces figures dans les sporanges de résistance d'*Allomyces macrogynus* Em. (ex. *A. javanicus* Knip). Leur forte basophilie (bleu de toluidine, pyronine) nous a incité à les soumettre aux tests de détection cytochimique de l'acide ribonucléique.

a) *Chromosphères pré-méiotiques*. Des sporanges de résistance âgés de 15 à 18 jours (sur milieu amidon-extrait de levure selon EMERSON⁴) ont été écrasés entre lame et lamelle, dans une petite goutte d'eau, afin de rompre leur membrane chitineuse et d'expulser leur contenu protoplasmique entouré d'une fine membrane (protoplaste). Une fixation de 30 min à l'alcool-formol 10% (1:1), sur lame, a toujours précédé les colorations ou les réactions cytochimiques. L'immersion des protoplastes dans les acides trichloracétique (10%, 1 h à 40°), perchlorique (10%, 1 h à 20°) ou chlorhydrique (HCl N, 1 nuit), suivie d'un rapide lavage à l'eau distillée et d'une coloration au bleu de toluidine (10⁻⁴) acétique (1%) a clairement montré que seuls les témoins non traités aux acides présentent de belles chromosphères bleu violacé.

L'immersion des protoplastes, après même fixation à l'alcool-formol, dans une solution de ribonucléase (Worthington Ltd, «protease-free», 1 mg/ml H₂O dist.), à 55° pendant 1 h et 2 h, a conduit au même résultat (Figure).

b) *Chromosphères post-méiotiques*. Les sporanges de résistance sont âgés de plus d'un mois (durée minimum nécessaire à la maturation, c'est-à-dire résorption des sphères pré-méiotiques et apparition des gros noyaux en prophase de méiose 1 selon WILSON³). Ils sont abandonnés 2 à 3 h dans une goutte d'eau distillée déposée sur lame, en chambre humide, à 25°. Ce délai est suffisant pour la germination des sporanges de résistance laquelle comprend, dans l'ordre chronologique, la méiose, l'apparition des chromosphères post-méiotiques et enfin la cytokinèse conduisant à la libération des zoospores «réduites». Ces cellules mobiles sont fixées sur lame à l'alcool-formol (30 min) et soumises à la digestion par la

solution de ribonucléase (1 et 2 h à 55°). Après 1 h d'incubation, les chromosphères post-méiotiques ou corps paranucléaires des zoospores ne sont déjà plus colorables par les colorants basiques tels que bleu de toluidine ou pyronine.

La même réaction ribonucléasique, appliquée aux protoplastes libérés par les sporanges de résistance écrasés peu avant libération des zoospores (1 1/2 à 2 h dans l'eau) a donné le même résultat, à savoir perte de la basophilie, avec les chromosphères post-méiotiques non encore organisées en corps paranucléaires autour des noyaux des futures zoospores.

Les chromosphères pré-méiotiques et les chromosphères post-méiotiques ou corps paranucléaires des zoospores de réduction représentent donc, à l'instar des corps paranucléaires gamétiques, des organites cytoplasmiques transitoires riches en acide ribonucléique. Soulignons ici que la présence de ces organites est toujours en relation avec le repos nucléaire. Ils sont rapidement résorbés – avec extension corrélative de la basophilie à l'ensemble du cytoplasme⁵ – lors de la reprise des activités mitotiques ou méiotiques.

Notons aussi que MACHLIS et OSSIA⁶ avaient observé que la résorption des chromosphères pré-méiotiques est activée par l'acide- β -indolylacétique. Maintenant que la nature ribonucléique de ces organites est précisée, il est possible de mettre en parallèle ce travail avec nos récentes observations concernant l'activation par l'acide β -indolylacétique de la résorption des corps paranucléaires fusionnés dans les zygotes d'*Allomyces* en voie de germination⁵.

Nous associons dans nos remerciements M. le Prof. F. CHODAT pour ses conseils et le Fonds national suisse de la Recherche scientifique pour son appui financier.

G. TURIAN

Institut de Botanique générale, Université de Genève, le 15 avril 1957.

⁴ R. EMERSON et D. L. FOX, Proc. Roy. Soc. London (B) 128, 275 (1940).

⁵ G. TURIAN, Exper. 12, 24 (1956).

⁶ L. MACHLIS et E. OSSIA, Amer. J. Bot. 40, 465 (1953).

Summary

Premeiotic chromospheres in the immature resistant sporangia (RS) of *Allomyces* lose their basophily after treatment with trichloroacetic acid, perchloric acid or ribonuclease.

Postmeiotic chromospheres in the mature RS, becoming the nuclear caps of the 'reduced' zoospores, do not stain with toluidine blue or pyronine after ribonuclease digestion.

It is concluded that, as gametic and zoosporic nuclear caps, pre- and postmeiotic chromospheres are transitory cytoplasmic organites rich in RNA.

L-Colony Production by *Salmonelleae* Isolated from the Mouse

It is well known that bacteria freshly isolated from the animal organism produce L-forms more easily than bacteria from old laboratory cultures (DIENES¹, TULASNE²; CARRÈRE and ROUX³; HAUDUROY⁴). Previous investigations showed that using the double layer inoculation method, L-colonies are produced even with not very high penicillin doses, and in a larger number than when applying a surface inoculation only.

We have now investigated the L-colony production by 20 strains of *Salmonella* from old laboratory cultures both with surface and double layer inoculation. The strains which did not produce L-colonies were inoculated in the mouse and then isolated, in order to study the L-colony production after animal passage.

Material and method.—20 *Salmonella* strains were employed, *Salmonella typhosa* (ZOFF) n. 57 and 58; type Aberdeen n. 90 and type Hvittingfoos n. 95 from the 'International Center of *Salmonella*, Copenhagen'; *Salm. typhosa* (ZOFF) n. 501, 571, 574, 592, 640, 1895, 650-1, 650, 652, *Salm. paratyphi* (KAYSER) n. 617, *Salm. schottmuelleri* (WINSLOW) 651, 676 and 679 from the 'Istituto Sieroterapico Italiano'; *Salm. Vevey*, 240 and 168 (Prof. TULASNE).

Media.—1.1% Difco Heart Infusion Agar containing 20% horse serum and 5000 U/ml G sodium penicillin (LEO). Difco Brain Heart Infusion. Synthetic medium containing in one liter: K_2HPO_4 9 g, KH_2PO_4 1 g, $CH_3CHOHCOONa$ 20 g, $Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.08 g, NaCl 0.004 g, $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.004 g, $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ 0.016 g, nicotinic acid 0.001 g, Casamino acids vitamin free 5 g, agar 11 g⁵.

Bacteria inoculation to—and isolation from—the mouse. **Production of L-colonies.**—0.5 ml of a bacterial suspension with constant density from a 24 h culture, is inoculated into the mouse peritoneum. After 8 h, the bacteria are isolated from the peritoneum and inoculated in 5 ml of broth. After 24 h, the bacterial cultures are inoculated into solid medium, on the surface and in double layer, for L-colony production.

Results.—The results showing the L-colony production by surface and double layer inoculation in natural and

L-colonies produced by *Salmonelleae* from laboratory cultures and after animal mouse passage. Surface and double layer inoculation in natural and synthetic medium. Penicillin 5000 U/ml.

Salmonella strains	Natural medium				Synthetic medium			
	Laboratory strains		Mouse strains		Laboratory strains		Mouse strains	
	sur-face	double layer	sur-face	double layer	sur-face	double layer	sur-face	double layer
57	—	—	—	—	—	—	—	—
58	—	—	—	—	—	—	—	—
501	—	—	—	—	—	—	—	—
571	—	—	—	L	—	—	—	—
574	—	—	—	—	—	—	—	—
592	—	—	—	—	—	—	—	—
640	—	—	—	—	—	—	—	—
1895	—	—	—	—	—	—	—	—
650-1	—	—	—	L	—	—	—	—
650	—	—	—	L	—	—	—	—
652	—	—	—	L	—	—	—	—
VEVEY	—	—	—	L	L	L	L	L
240	—	L	—	L	—	L	—	L
168	—	L	—	L	—	L	—	L
90	—	—	—	L	L	L	L	L
95	—	L	—	L	L	L	L	L
617	—	—	—	—	—	—	—	—
651	—	—	—	L	L	L	L	L
676	—	—	—	L	L	L	L	L
679	—	L	—	L	L	L	L	L

L means the experiments where L-colony production occurred.

in synthetic medium of bacteria from old laboratory cultures and after animal passage are illustrated in the Table.

Discussion and conclusions.—Our findings confirm the previous results on the importance of a recent isolation for the production of L-forms. We found that on natural media, L-colonies are produced in 4 laboratory strains out of 20 (20%) and in 12 strains isolated from the mouse out of 20 (60%).

The importance of the medium composition appears from experiments performed on synthetic medium where L-colonies were formed with surface inoculation and L-colonies were produced by a higher number of laboratory strains with the double layer inoculation.

As for the importance of the inoculation technique, it was observed that bacteria from old laboratory cultures, which do not produce L-colonies in cases of surface inoculation in natural media, produce them with double layer inoculation. The findings obtained with the double layer method are constant and reproducible and the L-colonies are transplantable on media having the same composition. The mechanism by which L-colonies are produced when using double layer inoculation, is undetermined.

P. DE GREGORIO and T. TERRANOVA

Institute of general Pathology, University of Turin, Italy, March 3, 1957.

Riassunto

Si è studiata la produzione di colonie L da 20 ceppi di *Salmonelleae* di laboratorio e dagli stessi ceppi dopo passaggio nel topino.

¹ L. DIENES, H. J. WEINBERGER, and S. MADOFF, J. Bact. 59, 755 (1950).

² R. TULASNE, Rev. Immunol. 15, 223 (1951).

³ L. CARRÈRE and J. ROUX, Montpellier méd. 47, 405 (1955).

⁴ P. HAUDUROY, Pr. méd. 63, 1079 (1955).

⁵ For the development of *Salm.* 58, 640, 1895, 650, 501, and 652 0.5 g/l of tryptophane have been added.