

Unilateral VIIIth nerve stimulation excites only the homolateral Mauthner's cell³. Bilateral simultaneous stimulation of the VIIIth nerve does not induce both Mauthner's cells to discharge at the same instant, as indicated by evoked potentials recorded from the Mauthner's axons in the spinal cord³. This supports the concept that these two motor neurons are reciprocally affected by VIIIth nerve stimulation. This phenomenon has been designated as simultaneous excitation of one neuron and inhibition of the other by afferent nerve stimulation.

The differential staining reaction suggests an intracellular chemical correlation with functional neuronal excitation and inhibition. The synaptic effect on these two cells may alter the intracellular Cl⁻ ion concentration in various parts of the neuron, which, in turn, determines the staining reaction of neurons by reduced silver^{8, 10}. Also, it may be that redox potential changes occur which cause the difference in silver deposition.

Inasmuch as the staining reaction of the two Mauthner's cells is altered by selective stimulation, it is postulated that the dendrites, the cell body, and the axon hillock region are of prime functional importance in nervous integration. The various synaptic endings which display a homogenous staining reaction may serve as activators for the intracellular activity rather than specific excitors or inhibitors¹¹.

E. RETZLAFF and JOAN FONTAINE

Research Division, Columbus Psychiatric Institute, Ohio State University, Columbus (Ohio), March 29, 1960.

Zusammenfassung

Die Mauthnerzellen des Welses (*Ameiurus*) zeigen nach Reizung des N. statoacusticus ein färberisches Verhalten, das erlaubt, sie von ungereizten Zellen mit Sicherheit zu unterscheiden.

Quantitativer Nachweis eines Abbaus von Zellulose und Lignin in der rollkranken Rebe

Im vergangenen Jahr wurde mitgeteilt, dass ein spezielles Virus die weitverbreitete Rollkrankheit der Rebe verursacht¹. Sekundär bewirkt es, dass die rollkranke *Vitis* Zellulose und Lignin anomal abbaut, wodurch die unverkennbaren Symptome (eingerollte Blätter und durchhängende Triebe) entstehen. Als spezifisches intermediäres Stoffwechselprodukt konnte ich 4-Methyl-D-glukuronsäure (4-M-D-g)² erfassen. Diese irreguläre Verbindung kommt in gesunden oder anders infizierten Weinstöcken nicht vor.

Bei schwer rollkranken Pflanzen fiel auf, dass der native Gehalt an Zellulose bei pathologisch gezeichneten Blättern und weichen Trieben auf 0,3% des normalen herabgesunken und Lignin vollkommen verschwunden war. Bei diesen stark zurückgefallenen Reben ergab die partielle Analyse der Kohlehydrate von den grünen Sprossorganen zu 54,7% 4-M-D-g. Leichter kranke, noch fast symptomlose Stöcke enthielten 22% Zellulose, 13% Lignin und 26,3% 4-M-D-g.

Da dieser charakteristische Zerfall der natürlichen Gerüstsubstanz offensichtlich mit dem progressiven Grad der Infektion fortschreitet, versuchte ich ausserdem, den eigentümlichen Metabolismus exakter stufenweise experimentell festzuhalten. Dazu wurden zehn einwandfreie Edelreiser gleichzeitig auf zehn rollkranke Unterlagen gepropft. Ab 15. Tag nach ausgeführter Kopulation

Tage nach der Inokulation	Gehalt an Zellulose in % der gesunden Kontrolle (= 100)	Gehalt an Lignin in % der gesunden Kontrolle (= 100)	Gehalt an 4-M-D-g in % der gesunden Kontrolle (= 0)
15	90,5	83,4	0,3
22	84,2	80,2	0,48
29	80,7	78,8	0,62
36	76,3	77,5	0,85
41	74,6	75,2	1,4
48	73,4	74,5	1,8
Leichtkranke Reben ohne Symptome. Infektionsdatum unbekannt	22	13	26,3
Schwerkranke Reben mit Symptomen. Infektionsdatum unbekannt	0,3	0	54,7

wurde in regelmässigen Abständen von sieben Tagen von den angesteckten, latent kranken Edelreisern je ein äusserlich unverändertes Blatt abgeschnitten und die drei fraglichen Inhaltsstoffe quantitativ chromatographisch bestimmt. Die Einzelergebnisse wurden einer Varianzanalyse nach FISHER und YATES³ unterworfen. Der mittlere Fehler beträgt $\pm 3\%$. Die Mittelwerte sind mit $P < 0,1$ gesichert. Die in der Tabelle zusammengestellten Daten bestätigen, dass mit zunehmender Dauer des virösen Befalls die pflanzlichen Festigungselemente schrittweise reduziert werden und damit verbunden 4-M-D-g kontinuierlich ansteigt.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanzierte die Untersuchungen, wofür bestens gedankt sei.

GERTRUD OCHS

Botanisches Institut der Universität Freiburg (Breisgau), 5. April 1960.

Summary

In leafroll-diseased grapevines, lignine and cellulose decompose anomalously. Therefore leaves and shoots of these vines curl characteristically down and inward. As a specific intermediate product, 4-methyl-D-glucuronic acid has been identified. The decomposition increases proportionally to the progress of the infection.

¹ GERTRUD OCHS, Exper. 15, 303 (1959).
² B. FLASCHENTRÄGER, *Lehrbuch der physiologischen Chemie* (Springer, Berlin 1951), p. 308.
³ R. A. FISCHER und F. YATES, *Statistical Tables* (Oliver & Boyd, London 1949).

Aspetti del nucleolo di cellule normali e patologiche¹

Nel nucleolo unico degli ovociti di alcune specie di Molluschi (*Aplysia depilans*, *Mytilus galloprovincialis*) e di Echinodermi (*Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula*) è stato possibile rilevare che, durante il corso dell'accrescimento ovocitario, in relazione alla rarefazione delle ribonucleoproteine, ed al passaggio da uno stato più denso ad uno meno denso delle sostanze nucleolari, si rendono manifesti

¹ Ricerche effettuate con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche Italiano.

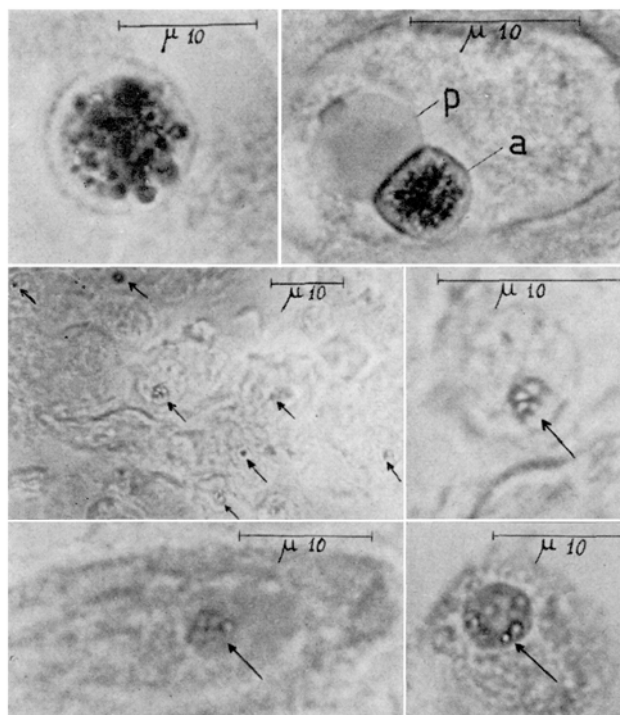
dei granuli nucleolonemali (Fig. 1), i quali di solito sono fra di loro collegati da sottili filamenti². Tali granuli, già visibili negli ovociti allo stato vitale, si pongono bene in evidenza nei preparati allestiti secondo una particolare tecnica di impregnazione con cloruro di platino³. Essi appaiono molto rifrangenti, e dotati di un caratteristico colore rosso-granato, che vira al giallo col variare dell'angolo di incidenza della luce; a nicols incrociati risultano divisi da una croce nera di interferenza in quattro quadranti molto luminosi; non presentano birifrangenza. Gli stessi granuli poi risaltano sulla *pars amorpha* del nucleolo, la quale appare dotata di una caratteristica colorazione verde-smeraldo. Il passaggio delle sostanze nucleolari da uno stato più denso ad uno meno denso viene interpretato in base alle colorazioni assunte col metodo Mallory; infatti, la rossofilia è l'indice probabile di uno stato di maggiore densità, l'azzurrofilia di uno stato di minore densità⁴. La varia concentrazione delle ribonucleoproteine è stata apprezzata con la colorazione Unna-Pappenheim, e con quella di Einarson, entrambe a pH opportuno e con controllo mediante ribonucleasi.

Le condizioni principali, che si realizzano negli ovociti presi in esame, sono le seguenti: nella previtellogenesi nucleoli rossofilo, con notevole quantità di ribonucleoproteine, e con granuli assenti o piuttosto scarsi; nella vitellogenesi nucleoli azzurrofilo, con poche ribonucleoproteine, e con granuli in numero più o meno abbondante. Fra tali condizioni esiste tutta una serie di stadi intermedi. Alla fine dell'accrescimento degli ovociti i nucleoli vanno in disfacimento; è possibile notare che la sostanza azzurrofila si diffonde nel carioplasma; i granuli si disgregano per dar luogo ad una sostanza apparentemente omogenea.

Le ricerche effettuate poi specialmente su ghiandole salivari di *Drosophila melanogaster*, su fegato, pancreas esocrino, tessuto nervoso centrale di varie specie di Vertebrati (*Diplodus annularis*, *Bufo vulgaris*, *Discoglossus pictus*, *Lacerta muralis*, *Fringilla serinus*, *Columba livia*, *Epimys rattus*), sui meristemi degli apici radicali di due piante (*Allium cepa*, *Vicia faba*) hanno permesso di riscontrare che in tali organi e tessuti si hanno, per quanto in maniera non frequente, le tre condizioni già rilevate negli ovociti, e cioè passaggio dalla rossofilia all'azzurrofilia (non sempre ben netta), rarefazione delle ribonucleoproteine, presenza di granuli nucleolonemali (Fig. 5 e 6).

Nei nucleoli delle cellule dei tumori esaminati (carcinoma della mammella di donna, linfogranuloma maligno umano, tumore di Walker del ratto) le tre suddette condizioni si osservano in maniera molto più frequente (Fig. 3) che nei tessuti normali. L'azzurrofilia, che i suddetti nucleoli manifestano, è di solito molto marcata; in relazione ad essa le ribonucleoproteine appaiono quasi del tutto assenti, ed i granuli nucleolonemali possono essere in numero anche cospicuo (Fig. 4).

Va rilevato ancora che i granuli nucleolonemali in tutti i tessuti considerati, normali e patologici, di animali e di vegetali, col metodo di impregnazione platinica appaiono sempre con le stesse caratteristiche fisiche già in precedenza riportate per i nucleoli degli ovociti. Nei tumori in particolare tali granuli erano stati già osservati da PAGE, REGAN e MACCARTY⁵, autori che, in merito ad essi, si erano pronunciati nel seguente modo: «We do not know the nature of these structures or their significance. It may be that they are concerned with the altered metabolism of rapidly growing cells of malignant tumors. They may be of some value in the differentiation of normal and malignant cells». Sul passaggio di stato poi delle sostanze degli inclusi nucleari (nucleoli) dei tumori, si erano in precedenza anche pronunciati altri autori, quali PECCHIAI e D'ANCONA⁶.



(Da sinistra a destra)

Fig. 1. Nucleolo di ovocita vitellogenetico di *Paracentrotus lividus* con numerosi granuli nucleolonemali. – Fig. 2. Nucleolo primario privo di granuli (p) ed anfinucleolo con molti granuli (a) di ovocita vitellogenetico di *Patella coerulea*. – Fig. 3. Porzione di tumore di WALKER con numerosi nucleoli con granuli (freccie). – Fig. 4. Particolare della figura 3, in cui si rilevano i granuli (freccia) a più forte ingrandimento. – Fig. 5. Nucleolo con granuli (freccia) di neurone del midollo spinale di *Discoglossus pictus*. – Fig. 6. Nucleolo con granuli (freccia) di cellula meristemica dell'apice radicale di *Vicia faba*.

Tenuto presente che le manifestazioni di azzurrofilia e di perdita delle ribonucleoproteine con relativa comparsa di un numero notevole di granuli hanno luogo nei nucleoli degli ovociti nell'ultimo periodo (terzo) del loro accrescimento, che nei vari tessuti normali le stesse manifestazioni non sono frequenti, e che infine nei tumori, come negli ovociti, sono molto frequenti, si può pensare che esse costituiscano l'indice di fenomeni di decadenza. Contro tale veduta sta però quanto è stato osservato negli ovociti in accrescimento di *Patella coerulea*, nei quali è possibile rilevare l'esistenza di due tipi distinti di nucleolo, e cioè del nucleolo primario, che ha un elevato metabolismo ribonucleoproteico, e degli anfinucleoli adulti, che non posseggono ribonucleoproteine^{2,7,8}. Altre differenze notevoli esistono fra tali due tipi; infatti, mentre il

² A. BOLOGNARI, Arch. Zool. ital. 44, 53 (1959).

³ A. BOLOGNARI, M. ALBANESE e A. DONATO, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 35, 764 (1959).

⁴ A. BOLOGNARI, Acta histochem. 2, 229 (1956).

⁵ R. C. PAGE, J. F. REGAN e W. C. MACCARTY, Amer. J. Cancer 32, 383 (1938).

⁶ L. PECCHIAI e S. D'ANCONA, R. C. Ist. lomb. Sci. Lett., Cl. Sci. 92, 424 (1958).

⁷ A. BOLOGNARI, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 34, 245 (1958).

⁸ A. BOLOGNARI, Boll. Soc. ital. sper. 35, 37 (1959).

⁹ A. BOLOGNARI, Acta histochem. 8, 504 (1959).

¹⁰ A. BOLOGNARI, Atti Soc. Pelor. Sci. fis. mat. nat., Messina 4, 367 (1957-58).

¹¹ A. BOLOGNARI, Nature 183, 1136 (1959).

nucleolo primario, che rimane piuttosto distanziato dalla membrana nucleare, si manifesta sempre rossofilo e privo di elementi nucleolonemali (Fig. 2), gli anfinucleoli, che contro la membrana nucleare vanno infine ad aderire strettamente, si dimostrano azzurrofilo e con elementi nucleolonemali più o meno complessi (Fig. 2). Ulteriori esami citochimici⁹ hanno permesso di individuare ancora nel nucleolo primario un complesso ribonucleoproteico con gruppi sulfidrilici, e negli anfinucleoli un complesso lipoglicoproteico con gli stessi gruppi. Entrambi i complessi sembrano regolati da una attività fosfataseica. Per i granuli nucleolonemali si è rinvenuto un complesso molto generico di glicoproteine, complesso nel quale, oltre ad essere assente l'acido ribonucleico, sembrano mancanti anche i lipidi, i gruppi sulfidrilici e l'attività fosfataseica. Tali diversità di costituzione chimica trovano il loro più convincente fondamento nei caratteri ultrastrutturali rilevati al microscopio elettronico^{10,11}.

I dati ricavati specialmente dagli ovociti di *Patella*, portano ad individuare nel nucleolo almeno due funzionalità principali, delle quali una legata essenzialmente alle ribonucleoproteine, e l'altra legata a sostanze non ancora bene identificate, ma comunque connesse con la presenza degli elementi nucleolonemali. Le manifestazioni relative alla seconda funzionalità si riscontrano con frequenza molto notevole tanto negli ovociti in accrescimento, che nelle cellule dei tumori, cioè dove si hanno le forme di metabolismo più esaltate. Non è improbabile che l'accostamento fra le attività nucleolari degli ovociti e quelle dei tumori possa portare in seguito ad una delucidazione sugli intimi meccanismi fisico-chimici intracellulari, che costituiscono il fondamento dell'insorgenza e del decorso delle cellule degli stessi tumori. Le nuove prospettive aperte dalla citofisicochimica, integrata dai dati forniti dalla microscopia elettronica, potranno essere di giovamento in tal senso.

A. BOLOGNARI

Istituto di Zoologia e di Anatomia comparata dell'Università di Messina, il 6 gennaio 1960.

Summary

On the basis of research carried out on various animal and plant tissues, both normal and pathologic, the author reaches the conclusion that two chief functions can be attributed to the nucleolus. One of them is related to the ribonucleoproteins, the other to less well known substances which are probably connected with nucleolonemal elements. It is also suggested that the second function seems to be a characteristic of cells with high metabolic activities, such as growing oocytes and tumor cells.

Maintenance of Visual Cells in vitro¹

The chemical reaction of the rhodopsin cycle has mainly been analysed by means of a rhodopsin solution which is extractable with detergents, particularly digitonin, from the whole retina or from the isolated outer segments of the visual cells^{2,3}. Recently, ARDEN⁴ measured the absorption spectrum of visual pigment in suspensions of intact rod outer segments from the frog's retina. In such a suspension the shifts of the absorption maximum toward the longer wave length compared to that of the extracted visual pigment was observed by BARER and SIDMAN⁵, WALD and BROWN⁶, and by SIDMAN⁷. It is of interest to study the biochemical changes of the visual pigments of

a single living photoreceptor cell following stimulation. This paper is concerned with a preliminary observation on the maintenance of single visual cells in tissue culture.

Retinae excised from dark-adapted frogs, *Rana pipiens*, were cut into small pieces on a cover glass which served as the bottom wall of a Rose chamber in order to keep all fragments of outer segments of the visual cells. The explants were cultivated under dialysis membranes in Rose chambers⁸. The fluid nutrient used was composed of 50% amphibian Tyrode, 45% human ascitic fluid, and of 5% chick embryonic extract, reinforced with glucose at a final concentration of 300 mg%. These Rose chambers were kept in darkness at room temperature.

A large number of the rod outer segments with or without ellipsoids, and single visual cells equipped with both inner and outer segments and a nucleus were also studied under cellophane covering the entire culture area. Some of the isolated rod outer segments were found to lose their cylindrical structure within about 1 h after they were set up in Rose chambers. During the first 18 h the complete outer segments were present and showed refractivity and their usual smooth sheath. After the 2nd day most of the outer segments began to rupture. Such a morphological change of the rod outer segments might be caused by damage to their rod sheaths during the course of cutting the retinae. After the 7th day it was observed that most of the outer segments, which had undergone degeneration, assumed round or oval shapes, and others were transformed into elongated structures, as indicated in Figure a and b. On the other hand, even after the 20th day, the refractivity and smooth sheath of the outer segments were well maintained in isolated single photoreceptor cells as well as in that of the retinal explants which kept their complete structure even after being cultured for one month. Epithelial outgrowth from explants was observed after 14 days of cultivation. However, the rate of outgrowth was not as high as that observed in embryonic chick retinae.

The presence of rhodopsin as indicated by the red tint was observed both in the isolated photoreceptor cell as well as in the cell clusters of explanted retinal fragments. Rhodopsin regenerated readily when Rose chambers were kept in darkness. The color intensity of rhodopsin, however, decreased after explantation and was weaker than in freshly excised retinae from dark-adapted frogs. No indication of the presence of rhodopsin was observed in the elongated outer segments, while it was demonstrable in the rounded outer segments after the 14th day. Autofluorescence indicating the presence of vitamin A was noticed in the rounded outer segments in which rhodopsin was diminished. When the Rose chambers were kept in the refrigerator, both the structure and rhodopsin in the outer segments of photoreceptor cells were preserved in contrast to those kept at room temperature.

It might be possible to study the mechanism of the rhodopsin cycle in a single photoreceptor cell and to in-

¹ Aided by a grant from the National Society for the Prevention of Blindness.

² H. J. A. DARTNALL, *The Visual Pigments* (John Wiley & Sons, Inc., New York 1957).

³ G. WALD, *Ann. Rev. Biochem.* 22, 497 (1953).

⁴ G. B. ARDEN, *J. Physiol.* 123, 377, 386 (1954).

⁵ R. BARER and R. L. SIDMAN, *J. Physiol.* 129, 60P (1955).

⁶ G. WALD and P. K. BROWN, *Science* 127, 222 (1958).

⁷ R. L. SIDMAN, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 74, 182 (1958).

⁸ G. G. ROSE, C. M. POMERAT, T. O. SHINDLER, and J. B. TRUNNELL, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 761 (1958).

⁹ Research fellow of the National Society for the Prevention of Blindness administered by Dr. G. ROBERTSON.