

tionssonde mit Lochkristall (Philips PW 4119) ausgezählt. Dann wurden die Proben mit 0,5 ml Äthanol (80%) versetzt und zerrieben. Im abgetrennten Extrakt wurde das FOB bestimmt.

Aus den Resultaten der Tabelle I ist ersichtlich, dass FOB von eisenhungrigen Pflanzen rasch aufgenommen wird, dass die Eisenaufnahme mit der FOB-Aufnahme korreliert und dass das komplexierte Eisen (Fe^{+3} -FOB) im Vergleich zum freien ionischen Eisen rascher in die oberirdischen Teile transportiert wird bei gleichen Ausgangskonzentrationen (5,8 μg Eisen pro ml).

Die stimulierende Wirkung von FOB auf die Eisenaufnahme konnte in einer zweiten Versuchsanordnung, wo anstatt Hoagland-Lösung nur destilliertes Wasser verwendet wurde, eindeutiger gezeigt werden, weil Ausfällen des freien Eisenions nicht in Betracht zu ziehen ist. Wie die Resultate der Tabelle II zeigen, wird auch unter diesen Bedingungen der Eisenkomplex rascher als das freie Eisenion in die oberirdischen Pflanzenteile transportiert. Ausgangskonzentration des Eisens: 11,6 μg pro ml.

Die Ursache der stimulierenden Wirkung von FOB auf die Eisenaufnahme unter den Bedingungen des zweiten Experimentes ist nicht bekannt. Gewisse Versuchsergebnisse (unveröffentlicht) deuten darauf hin, dass Eisen aus der FeCl_3 -Lösung rasch an oder in die Wurzel sorbiert wird, aber langsamer an die oberirdischen Teile abgegeben wird.

Summary. Ferrioxamin B (FOB), an iron chelating cyclopeptide, is shown to be absorbed and translocated in tomato plants from nutrient solution. Chelated iron (FOB) is transported to the upper parts of tomato plants more rapidly than ionic iron (FeCl_3).

E. STUTZ

Eidgenössische Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil (Schweiz), 25. März 1964.

Fate of Cartilage Cells in Limb Regeneration in the Axolotl (*Ambystoma mexicanum*)

Limb regeneration in Amphibia involves a morphological de-differentiation of tissue cells to form a blastema, which subsequently develops into a complete new limb. The de-differentiation leading to blastema formation appears to be complete, so far as can be determined from electron microscopical and other observations (see review by HAY¹). Thus, highly specialized cells, such as those of cartilage and muscle, lose their characteristic morphology and become indistinguishable from each other in the blastema. For this reason their eventual fates have remained obscure, and it is not known whether they remain true to type or revert to a pluripotent state and change in type during regeneration. The present paper records an attempt to solve this problem for one cell type – that of cartilage.

Method. Our experiments involved the grafting of triploid cartilage into diploid limbs from which the distal two-thirds of the humerus had previously been removed. Host and donor larvae, 95 to 105 mm in length, were kindly provided by Dr. R. R. HUMPHREY. Both were from a dark strain of axolotls which occasionally gives triploid offspring (HUMPHREY²). Bone-free cartilage from the distal portion of the triploid humerus was placed in 1% trypsin, made up in a solution containing (in g/l): NaCl, 3.12; KCl, 0.078; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.020; NaHCO_3 , 0.389; adjusted to pH 8.0 with 0.1 N KOH. The cartilage, while in the enzyme solution, was stripped completely free of its perichondrium and then washed thoroughly in STEINBERG'S³ solution before being grafted into the host limb. After the grafts had healed in place for 5 to 7 days the host limbs were amputated at the elbow, just distal to the grafted cartilage. Regeneration was allowed to proceed for 30 or 45 days, by which time the digital cartilages were well formed. The regenerates were then fixed in Bouin's fluid, sectioned at 10 μ , and stained according to the azure B method of FLAX and HIMES⁴ – a method particularly valuable for staining nucleoli. Nucleolar number was determined in the newly formed

cartilage, muscle, and epidermis of the regenerates. Cells derived from the triploid cartilage graft would be expected to display a maximum of 3 nucleoli per nucleus, compared with a maximum of 2 nucleoli per nucleus for cells of host (diploid) origin. Both triploid and diploid cells may, of course, show fewer than the maximum nucleolar number as a result of nucleolar fusion. Thus it is only the maximum number per nucleus, exhibited in a population of cells, that can serve as a reliable indication of the ploidy of the population (FANKHAUSER and HUMPHREY⁵).

Results. 39 regenerates of diploid limbs containing grafted triploid cartilage were studied. In 28 cases the regenerates contained no triploid cartilage, and other tissues were also devoid of triploid cells. In these cases the grafts presumably failed to survive, or to be included in the amputated regenerate. The remaining 11 regenerates all showed significant numbers of cartilage nuclei with 3 nucleoli, indicating graft survival. The cartilage, muscle, and epidermis of these regenerates were examined with the following results.

In 4 cases the triploid cartilage was present in the proximal part of the amputated regenerate but was confined to the stump and failed to participate in the regeneration. The newly formed cartilage, muscle, and epidermis contained no nuclei with 3 nucleoli, so far as could be seen.

In 7 cases the grafted triploid cartilage survived and participated in regeneration, as indicated by the presence of nuclei with 3 nucleoli in the newly formed cartilage. In 3 of these cases quantitative analyses were made on rep-

¹ E. D. HAY, in *Regeneration* (ed. D. Rudnick, Ronald Press, New York 1962), p. 177.

² R. R. HUMPHREY, *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, in press.

³ M. STEINBERG, *Carnegie Inst. Washington Year Book* 56, 347 (1957).

⁴ M. H. FLAX and M. H. HIMES, *Physiol. Zool.* 25, 297 (1952).

⁵ G. FANKHAUSER and R. R. HUMPHREY, *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.* 29, 344 (1943).

representative sections. Approximately 5000 cartilage nuclei were examined in each limb, and 1 to 5% of these nuclei contained 3 nucleoli. Comparable counts done on humeral cartilage of control triploid limbs gave percentages ranging from 19 to 23%. This comparison indicates that the grafted triploid cartilage contributed about 5 to 20% of the regenerated cartilage in the experimental limbs.

The 7 limbs in which the grafted triploid cartilage participated in regeneration were examined carefully to determine whether the graft gave rise to cell types other than chondrocytes. Adequate nucleolar number determinations could be made in two tissues – muscle and epidermis. In 5 of the 7 limbs the regenerated muscle contained no triploid nuclei, so far as could be determined. In the remaining two regenerates we found in the muscle a total of 4 scattered nuclei each with 3 nucleoli, out of a total of about 10,000 nuclei examined. Little significance can be attached to this observation, for reasons mentioned below.

Examination of the epidermis of the 7 regenerates showed the following. In 1 case the epidermis contained no nuclei with 3 or more nucleoli. In the remaining 6 cases we found widely scattered small groups of polyploid cells in the regenerated epidermis. However, in every case the maximum nucleolar number was 4 rather than 3, indicating that the cells were derived from host cells in which a doubling of chromosome number had occurred, rather than from the grafted triploid cells. The same ex-

planation could also be offered for the very rare trinucleolated muscle cells mentioned above, which could be tetraploid host cells in which a nucleolar fusion had occurred.

The results obtained in this study do not provide any evidence to indicate that cartilage cells change in type during limb regeneration. The possibility that cell type changes might occasionally occur is, of course, not excluded. However, our experiments indicate that if such changes take place they do so in a frequency so small that they cannot be detected by the nucleolar number marker⁶.

Résumé. Nous avons suivi de près, pendant la régénération, le comportement du cartilage triploïde greffé dans les membres diploïdes en nous servant du nombre nucléolaire comme marque cellulaire. La greffe de cartilage a fourni des cellules de cartilage au régénérat, mais elle n'a pas contribué à la découverte de cellules d'autres espèces.

J. PATRICK and R. BRIGGS

*Department of Zoology, Indiana University,
Bloomington (USA), January 23, 1964.*

⁶ This work was supported in part by a research grant from the Research Grants Division, U.S. Public Health Service (RG-5850).

Abschwächung der Toxizität von Nicotin durch Erhöhung der Thrombocytenzahl

Nicotin setzt bei intravenöser Injektion Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark frei; in früheren Arbeiten wurde von uns nachgewiesen, dass durch Nicotin nicht nur die Catecholamine, sondern auch die biogenen Amine 5-Hydroxytryptamin (Serotonin, 5-HT) und Histamin liberiert werden^{1,2}. Im Blut kreisende biogene Amine, insbesondere 5-HT, werden durch die Thrombocyten gespeichert und dadurch zeitweilig inaktiviert; die Blutplättchen können ein Vielfaches ihres ursprünglichen physiologischen Gehaltes an 5-HT aufnehmen³.

Wir prüften anhand der Toxizität des Nicotins, ob diese Fähigkeit einen Schutzmechanismus gegen die plötzliche Überflutung des Organismus mit pharmakologisch sehr wirksamen biogenen Aminen darstellt.

Methoden. Zu den Versuchen wurden 2,9–4,3 kg (Mittelwert 3,4 kg) schwere Kaninchen verwendet. In flacher Pernoxonarkose wurde den Tieren je ein Polyäthylkatheter in die A. carotis und in die V. jugularis gelegt. 7 Tieren wurde durch den Venenkatheter eine Thrombocyten suspension infundiert. Diese bestand aus unterschiedlichen Mengen von Thrombocyten, welche aus dem Blut von Spendertieren durch differenziertes Zentrifugieren² isoliert wurden. Die so gewonnenen Thrombocyten haben die Fähigkeit zur Aufnahme von Aminen nicht verloren². Sie wurden in physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von 1000 IE Heparin suspendiert und mit einigen ml aus der Carotis entnommenen Blutes des Versuchstieres vermischt. Allen anderen Versuchstieren wurde die gleiche Menge Kochsalz-Heparin-Blut-Mischung injiziert.

Die Bestimmung der Thrombocytenzahl erfolgte im arteriellen Blut nach der Infusion der Thrombocyten, bzw. der Kontroll suspension. Die Zählung der Thrombocyten wurde nach der Methode von FEISLY-LUDIN in der Modifikation von DERLATH⁴ durchgeführt. Unsere Versuchstiere wiesen im Durchschnitt einen Thrombocytennormalwert von 347 000/mm³ Blut auf. Durch die Infusion von aus 250 ml Blut gewonnenen Thrombocyten wurde z. B. die Thrombocytenzahl bei einem Versuchstier von 580 000/mm³ auf 1 380 000/mm³ erhöht. Nach der Infusion der Thrombocyten suspension wurde den Kaninchen 0,66 mg/kg Nicotin (freie Base in NaCl-Lösung) in die V. jugularis in Abständen von je 1 min bis zum Atemstillstand injiziert. Unmittelbar danach wurden die Tiere aus der A. carotis entblutet. Das Blut wurde durch differenziertes Zentrifugieren nach der Methode von LÖHR⁵ in Erythrocyten, Leukocyten, Thrombocyten und Plasma aufgeteilt. In den einzelnen Fraktionen wurde der Nicotinhalt nach Isolierung des Alkaloids durch alkalische Wasserdampfdestillation mit einer Methode bestimmt, welche auf der Extinktionszunahme des Nicotins bei 259 m μ beim Wechsel vom neutralen zu saurem Milieu beruht⁶.

¹ H. SCHIEVELBEIN, E. WERLE und W. JACOBY, *Naturwiss.* 48, 602 (1961).

² H. SCHIEVELBEIN und E. WERLE, *Psychopharmacologia* 3, 35 (1962).

³ H. SCHIEVELBEIN, E. WERLE und INGRID ECKERT, *Arzneimittelforschung* 13, 211 (1963).

⁴ S. DERLATH, *Ärztl. Forschung* 1956, 552.

⁵ G. W. LÖHR und H. D. WALLER, *Klin. Wschr.* 37, 833 (1959).

⁶ Beiträge zur Tabakforschung Heft 8, 315 (1962).