

Under these 3 different experimental conditions the amount of pigment seems to be related to the ratio kinetin/auxin; more specifically, chloroplasts differentiation is enhanced by high relative concentration of K, while it is independent of the absolute amount of auxin and kinetin. Cultures grown on LS medium show a higher rate of pigmentation. This medium, however, does not influence the effect of the hormonal ratio between kinetin and auxin. Figure 4 shows the increase in weight

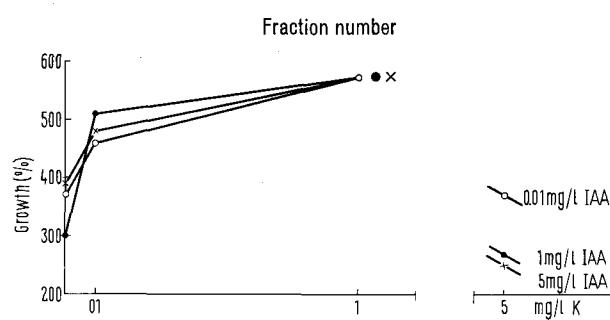


Fig. 4. Increase in weight of the explants grown on MS medium in the presence of different amounts of K and IAA.

of the explants grown in the presence of K and IAA on MS. This graph clearly shows that, in the range of hormone concentrations which have been used, the increase in weight is strictly dependent on the amount of K present and independent of the amount of auxin⁷.

Riassunto. Nell'intento di stabilire i fattori responsabili del differenziamento dei cloroplasti in culture di tessuto di *Daucus carota*, sono stati eseguiti esperimenti al fine di scegliere tra le 3 ipotesi possibili: la chinetina stimola la formazione dei cloroplasti; le auxine inibiscono la formazione dei cloroplasti; il differenziamento dei cloroplasti dipende dal rapporto chinetina/auxina, indipendentemente dalla quantità assoluta dei 2 ormoni. Sidimostra che quest'ultima ipotesi è corretta.

M. BANDIERA and G. MORPURGO

Centro di Genetica Evolutiva del CNR,
Istituto di Genetica, Università di Roma,
I-00185 Roma (Italy), 24 November 1969.

⁷ The technical help of G. CONTI is gratefully acknowledged.

PRO EXPERIMENTIS

Nouveaux résultats à propos de l'histologie nerveuse chez les Invertébrés

Tout récemment, la technique de fixation-coloration de MAILLET nous donna de nouveaux résultats. Ceux-ci ont permis de vérifier l'hypothèse que nous formulions auparavant en vue de préconiser son utilisation dans les travaux d'histologie du système nerveux périphérique chez les Invertébrés. Grâce à cette méthode, nous¹ avons pu décrire diverses structures nerveuses au niveau des palpes labiaux d'*Anodonta* (Mollusque Lamellibranche). Entretemps, MAILLET et al.^{2,3} publièrent des études critiques concernant l'utilisation et les limites de cette technique. Ils tentèrent d'en expliquer la portée histochimique grâce à l'ultramicroscopie. Malgré les interprétations récentes soulevées par WIENKER⁴, EBNER et NIEBAUER⁵, PELLEGRINO de IRALDI et GUEUDET⁶, ... cette dernière question reste controversée.

Nous avons aussi utilisé la technique de MAILLET chez les Arthropodes. Une coloration convenable du tissu nerveux paraît très difficile à obtenir dans ce matériel zoologique. Nos essais démontrent l'importance du revêtement chitineux qui constituerait par sa structure et sa nature, une sorte de «barrière» vis-à-vis des propriétés particulières de coloration propre au mélange osmique.

Chez *Daphnia pulex* (Crustacé Cladocère), nous avons obtenu des résultats intéressants uniquement et seulement après avoir endommagé ou décapité les animaux d'expérience. Des fibres nerveuses variqueuses imprégnées par le MAILLET peuvent être observées dans le protocérébrum et la commissure œsophagienne. Un groupe ventral de 4 cellules neuro-sécrétrices est mis en évidence. Le deutocérébrum possède une affinité particulière pour le mélange fixateur. En périphérie, une fibre musculaire est

enserrée par une terminaison nerveuse (Figure 1). L'intestin montre un réseau dense d'éléments osmophiles et nerveux (Figure 2). Simultanément, des animaux intacts, utilisés comme témoins, furent fixés dans des conditions identiques. Les préparations microscopiques indiquent une bonne conservation des tissus fixés, mais aucun élément nerveux n'a pu être mis en évidence.

Chez *Tenebrio molitor* (Insecte Coléoptère), seuls les organes disséqués et extirpés ont donné de bons résultats; ainsi la Figure 3 montre de fines terminaisons variqueuses autour des fibres musculaires du proventricule.

Au cours de nos investigations visant à inventorier les groupes zoologiques auxquels la technique de MAILLET pourrait être utilisée, nous nous sommes attachés à plusieurs embranchements: les Cœlentérés, les Annélides, les Mollusques et les Arthropodes. Chez les Cœlentérés (Hydraires, Siphonophores, Automéduses), la technique ne nous donna aucun résultat intéressant. Jusqu'à présent, les Annélides et les Mollusques nous ont révélé les meilleurs résultats par la régularité et la finesse de coloration des éléments nerveux.

¹ J. GILLOTEAUX, Annls. Soc. R. Zool. Belg. 98, 101 (1968).

² M. MAILLET, C. r. Ass. Anat., Paris 140, 233 (1968).

³ CH. CLARA, CL. DAVID et M. MAILLET, Z. mikrosk.-anat. Forsch. 79, 292 (1968).

⁴ M. G. WIENKER, Z. mikrosk.-anat. Forsch. 76, 70 (1967).

⁵ H. VON EBNER et G. NIEBAUER, Mikroskopie 22, 299 (1967).

⁶ A. PELLEGRINO DE IRALDI et R. GUEUDET, Z. Zellforsch. 97, 178 (1968).

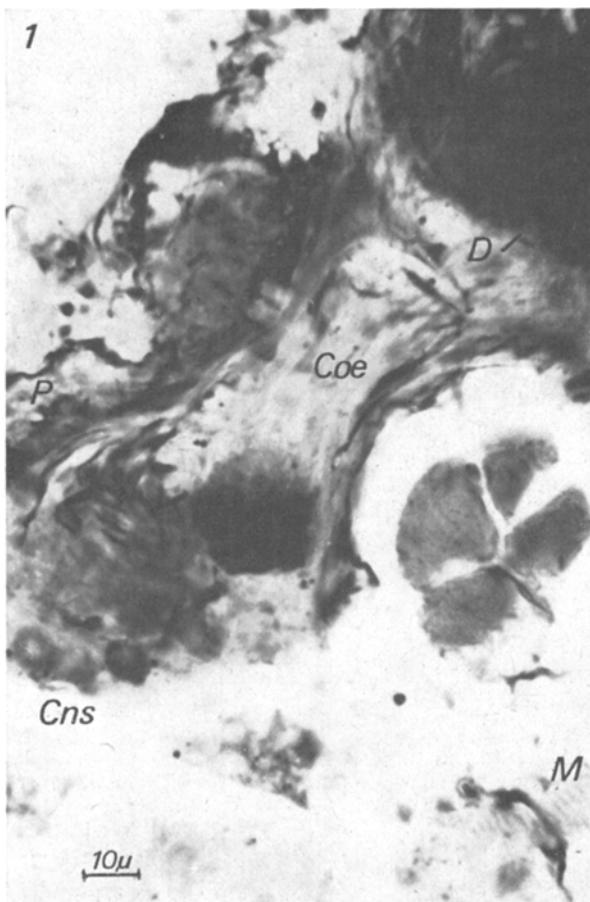


Fig. 1. *Daphnia*: Le protocérébrum (P) et la commissure œsophagienne (Coe) contiennent de grosses fibres nerveuses ayant une affinité pour le fixateur. Cns, groupe ventral de cellules neurosécrétaires; D, deutocérébrum; M, fibre musculaire (fixation de MAILLET).

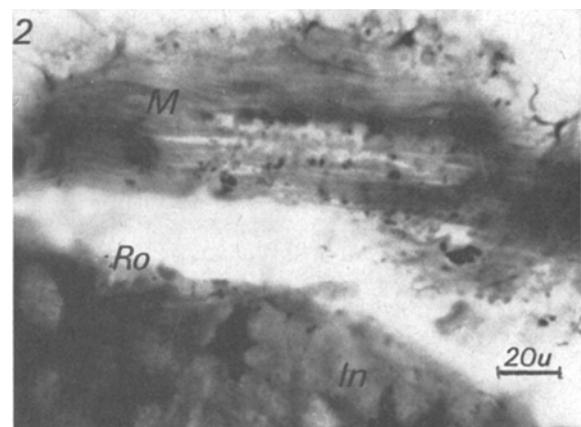


Fig. 2. Intestin de *Daphnia* (In); Ro, réseau osmophilic et nerveux; M, fibre musculaire avec terminaisons nerveuses (MAILLET).

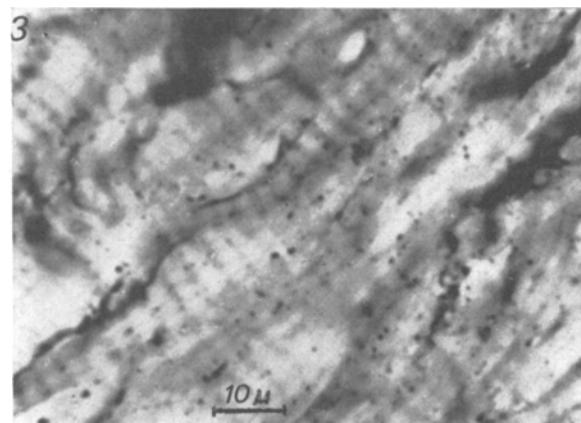


Fig. 3. Proventricule chez *Tenebrio*; terminaisons variqueuses autour des fibres musculaires (MAILLET).

En ce qui concerne le protocole général de la technique, il est similaire à celui décrit par MAILLET². Au moment de l'emploi, 2 ml d'une solution de tétraoxyde d'osmium à 2% de pH 7,3-7,4 (tampon de Michaelis) sont mélangés à 8 ml d'une solution d'iodure de zinc à 3%, pour une pièce de $1/2$ cm³ environ. L'iodure commercial s'est révélé au moins équivalent à la solution préparée selon le procédé de JABONERO⁷. Cette dernière solution-mère offre l'inconvénient de ne pouvoir être stockée longtemps. Une vieille solution donne lieu à des artefacts sous forme de granules dans les préparations microscopiques. Le matériel biologique utilisé est fixé et coloré durant un laps de temps n'excédant pas 20 h à la température du laboratoire (environ 20°C). On lave à l'eau distillée pendant 1 h et la déshydratation est obtenue par l'alcool butylique. L'imprégnation des objets et le déparaffinage des coupes – qui précède immédiatement le montage au beaume – sont réalisés par le xylène.

En conclusion, nous pensons que la technique de fixation-coloration de Champy-Maillet pourrait être utilisée en vue de l'étude histologique du système nerveux périphérique chez de nombreux Invertébrés. Elle pourrait être comparée et associée à la méthode par fluorescence de FALK^{8,9}.

Summary. MAILLET's² osmium-zinciodide technique gave interesting results in Arthropods by means of nerve histology. Tests demonstrated the importance of the chitinous cuticles as 'barrier' to the particular staining properties of the MAILLET's mixture. It would seem possible to compare this technique with the FALK's⁸ fluorescence method.

J. GILLOTEAUX

Université Catholique de Louvain,
Laboratoire de Morphologie animale,
Institut de Zoologie,
B-3000 Louvain (Belgique), 25 juin 1969.

⁷ V. JABONERO, Trab. Inst. Cajal Invest. biol. 54, 37 (1962).

⁸ B. FALK, Acta physiol. scand., Suppl. 56, 197, 1 (1962).

⁹ Nous remercions M. le Professeur DEMAL qui nous a permis de mener à bien ce travail. Celui-ci a été partiellement effectué à la Station Zoologique de Villefranche-sur-Mer (Université de Paris) grâce au soutien du Ministère de l'Education Nationale et de la Culture de Belgique. Là, nous avons récolté et expérimenté la technique histologique sur divers animaux marins.