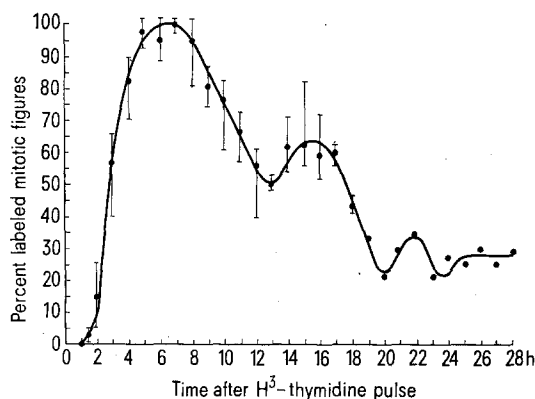


is readily apparent that the sum of G_2 , S, and M (mitosis) is greater than the total generation time as determined from the PLM curve, G_1 not considered. The assumption that the G_1 phase may be lacking is supported by similar observations on Ehrlich ascites tumor cells^{6,7}, rabbit ameloblasts⁸, and Chinese hamster lung cells⁹. Nevertheless, it is not expected that the remaining phases should exceed the calculated T_c .

The initial wave of the present curve is nearly identical to those reported for opossum stomach cells¹⁰. As a result, the calculations for G_2 and S of opossum lymphocytes in vitro can most likely be accepted with some degree



PLM curve for opossum lymphocytes in vitro. Each dot between 1 and 18 h represents the mean value for 2-5 animals; vertical lines represent the range of labeled mitoses observed at each interval.

of accuracy. On the other hand, the rapid appearance of subsequently damped out peaks suggests considerable variability in cycle times and phases of individual cells. It is suggested that this variation exists primarily in the length of G_1 of perhaps two or more functionally diverse populations of lymphocytes¹¹.

Résumé. La courbe PLM (pourcentages indiqués de mitoses) pour les lymphocytes d'opossum in vitro a fait preuve d'un T_c (temps générateur) que n'atteignait pas la somme de G_2 , S, et M (mitosis). Tandis que les calculations pour les phases de G_2 et S sont représentées avec exactitude sur la courbe, il y a des variations dans le G_1 parmi les population de lymphocytes au fonctionnement divers (au nombre de deux ou peut-être plus parmi celles-ci) qui sont responsables de ce désaccord apparent.

L. K. SCHNEIDER

Department of Anatomy, University of Arizona,
College of Medicine, Tucson (Arizona 85724, USA),
26 October 1972

⁶ R. BASERGA, Arch. Path. 75, 156 (1963).

⁷ P. K. LALA and H. M. PATT, Proc. natn. Acad. Sci., USA 56, 1735 (1966).

⁸ W. E. STARKEY, J. Br. dent. Ass. 115, 143 (1963).

⁹ E. ROBBINS and M. D. SCHARFF, J. Cell Biol. 34, 684 (1967).

¹⁰ J. D. THRASHER, Expl. Cell Res. 57, 441 (1969).

¹¹ Supported by United States Public Health Service Grant Number 5T1 GM 136-09 and by a grant from the American Cancer Society, Arizona Division, Incorporated.

Substructure of Paramyosin Filaments Prepared by Freeze-Substitution Technique

Certain mollusc muscles – the so-called 'catch muscles' – have thick filaments with very large dimensions. These filaments contain the unique protein, paramyosin¹, which forms the core of the filament, and myosin which is probably present at the surface^{2,3}. Small angle X-ray-diffraction revealed that the thick filaments of the catch muscles had a 725 Å axial periodicity with a prominent 145 Å repeat^{4,5}. Electron micrographs of isolated and negatively stained or shadowed filaments showed a surface net pattern from which ELLIOTT and LOWY⁶ proposed a model of a helicoidal structure of the paramyosin filaments. In longitudinal sections of the oyster adductor muscle, ELLIOTT⁷ observed thick filaments with a variety of band patterns which he interpreted in terms of a paramyosin filament consisting of a stack of longitudinal lamellae. A very clear substructure of paramyosin filaments can be observed in freeze-substituted preparations of catch muscles, as demonstrated in this study.

Material and methods. The muscle employed was the anterior byssus retractor muscle (ABRM) of *Mytilus edulis* which was frozen with isopentane, substituted with glycol at -50°C ⁸, embedded without any fixation in Araldite resin, sectioned and stained with uranyl acetate and lead citrate.

Results and discussion. Figure 1 shows a longitudinal section through a muscle fibre of the ABRM. The filaments present a complex and variable fine structure. Most obvious is a lattice-like pattern produced by two sets of bands being placed obliquely to the axis. At one side, consecutive bands (thickness 100 Å) are 720 Å apart

and have an angle of about 15 degrees in the direction of the filament axis. On the other side, the bands (thickness 160 Å) show a 360 Å periodicity and an angle of 45–50 degrees. The dimensions of the periodic markings appear to be identical in both, the exact longitudinally sectioned filaments as well as in those cut obliquely. At a higher magnification each band can be seen to comprise series of short dark lines or spots, staggered to each other (Figure 2). Preliminary results obtained with the MARKHAM technique suggest that the lines and spots are composed of such a geometrical pattern that each lattice point gives rise to a 725 Å periodicity.

Another typical pattern observed in the longitudinally sectioned filaments consists of a repeat of 5 dark cross lines, separated by a wide unstained gap. The length of one repeating unit is again around 725 Å. The cross striation can extend over a great part of the filament diameter (Figure 3), or it may occur only at the filament periphery, whereas the net-like pattern is present in the middle part (Figure 1). The various patterns observed

¹ A. J. HODGE, Proc. natn. Acad. Sci. USA 38, 85 (1952).

² J. HANSON and J. LOWY, Proc. R. Soc. B 154, 173 (1961).

³ A. G. SZENT-GYÖRGYI, C. COHEN and J. KENDRICK-JONES, J. molec. Biol. 56, 239 (1971).

⁴ R. S. BEAR, J. Am. chem. Soc. 66, 2043 (1944).

⁵ C. E. HALL, M. A. JACKUS and F. O. SCHMITT, J. appl. Phys. 16, 459 (1945).

⁶ A. ELLIOTT and J. LOWY, J. molec. Biol. 53, 181 (1970).

⁷ G. F. ELLIOTT, J. molec. Biol. 10, 89 (1964).

⁸ D. C. PEASE, J. Ultrastruct. Res. 23, 280 (1968).

in longitudinally sectioned filaments may reflect the different directions and thicknesses in which the filaments have been cut. A cross-sectioned fibre is illustrated in Figure 4. Here, although exactly round filament profiles do not show any regular pattern, somewhat skew cut filaments are seen to be crossed by 2 or 3 curved dark lines, which are always at a right angle to the great ellipse axis. These dark lines probably represent projections of the oblique bands, seen in the longitudinally sectioned filaments.

The filament patterns described here could not be found in muscles which were fixed after the freeze substitution had been performed, indicating that there are differences of preferential attachment of heavy stains in the fixed and fresh preparations. Although there is some evidence about staining properties in fixed tissue, it is not possible at the moment to decide the nature of this attachment in the freeze-substituted preparations. Neither can we comment as to whether it is due to the chemical binding or only to the stain filling holes in the

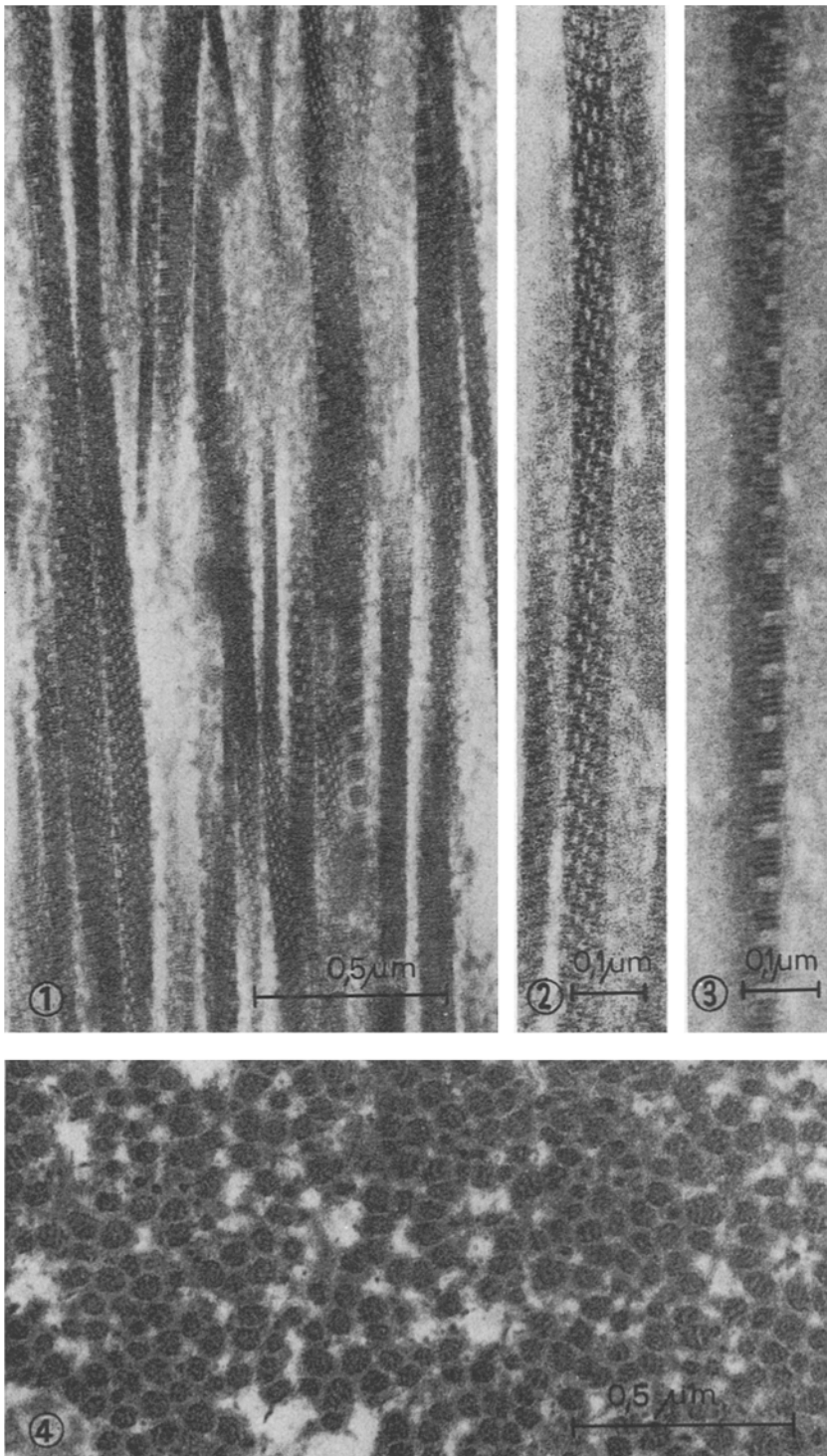


Fig. 1. Longitudinal section of ABRM of *Mytilus* which had been freeze-substituted with glycol and stained with uranyl acetate and lead citrate.

Fig. 2. Paramyosin filament showing a net-like appearance.

Fig. 3. Filament with a periodic cross banding.

Fig. 4. Transverse section. Filaments with internal layering.

structure. In any case, however, the staining pattern must provide some information on the local packing relations of the molecules in the filament. For studying the substructure of paramyosin filaments, the freeze-substituted preparations have advantages over the isolated filaments, since here not only the surface but their interior composition can also be revealed. Moreover, it is also possible by this technique to get various views from the same filament by examining serially sectioned or tilted filaments. A model of the three dimensional reconstruction of the paramyosin filaments, employing these techniques will be presented shortly (HEUMANN, in preparation).

Zusammenfassung. In den Paramyosinfilamenten des Byssusretraktors von *Mytilus edulis* wurde eine komplizierte Substruktur beobachtet, wenn das Gewebe nicht fixiert, sondern gefriersubstituiert wurde. Längsgetroffene Filamente zeigen ein netzartiges oder quergebändertes Aussehen, querschnittene Filamente weisen häufig eine scheibenartige Struktur auf.

H.-G. HEUMANN

Lehrstuhl für Zellenlehre der Universität,
Berliner-Strasse 15, D-69 Heidelberg (Germany),
18 September 1972.

La synthèse de l'ADN prémitotique et préméiotique dans les cellules germinales de l'embryon femelle de la caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*)

Dans des travaux précédents^{1,2} nous avons étudié la synthèse de l'ADN préméiotique dans les cellules germinales de l'ovaire embryonnaire de poulet. Nous avons effectué une étude semblable chez la caille japonaise. La différenciation sexuelle de la gonade gauche y devient visible sous la loupe binoculaire à peu près 6 jours après le début de l'incubation. Dans des œufs fécondés de caille japonaise (type sauvage), incubés pendant 6 à 12 jours à une température de 39,5°C, on découpe une petite fenêtre dans la coquille, au niveau de la chambre à air. Les œufs sont fixés en position verticale avec la fenêtre dirigée vers le haut. Sur la membrane de la poche à air 10µCi d'une solution aqueuse de thymidine-³H (10 Ci/mM, 1mCi/ml) sont déposés. Après 2 h ou après 24 h, les ovaires gauches des embryons femelles sont fixés dans l'alcool acétique (3 v:1 v) pendant 1 h. Les ovaires sont inclus dans la paraffine et coupés à 5 µm. Après déparaffinage les coupes sont colorées par la réaction nucléale de Feulgen et contre-colorées au «fastgreen». Pour l'étude cytologique préautoradiographique des régions du cortex de l'ovaire sont photographiées avec l'objectif à immersion (× 63) de l'ultraphot Zeiss. Une iconographie aussi complète que possible de certaines parties des coupes est faite à l'aide de diapositives en couleurs et de dessins avec un maximum de détails cytologiques. Alors la lame couvre-object est enlevée et les coupes sont rehydratées. Elles sont enfin émulsionnées par immersion. L'émulsion nucléaire employée est du type L4 de Ilford. Après exposition d'à peu près un mois et le développement de l'émulsion, les coupes sont recolorées à l'hématoxyline-éosine.

Résultats. Chez l'embryon de 6 jours on voit dans l'ovaire des cellules germinales encore peu nombreuses. Leur noyau contient de nombreux petits granules de chromatine Feulgen positifs, liés par des filaments très fins. Chez l'embryon âgé de 7 à 8 jours on voit dans la

partie centrale du cortex ovarien des oogonies en mitose. On observe aussi des oogonies en interphase avec un gros nucléole central et dans son voisinage immédiat quelques amas arrondis de chromatine Feulgen positive (Figure 1). Chez l'embryon de 8 jours à 9 jours on voit apparaître dans la partie centrale du cortex un nouveau type de cellule germinale. Son nucléoplasme est beaucoup plus clair que celui de l'oogonie. Sa chromatine est condensée en quelques volumineux amas Feulgen positifs paranucléolaires. La membrane nucléaire est très fine mais nettement tranchée (Figure 3). Le noyau contient un gros nucléole central coloré en vert par le «fastgreen». Quelques très fins granules chromatiniens se trouvent appliqués contre la partie interne de la membrane nucléaire. Des filaments très fins colorés en vert par le «fastgreen» relient le nucléole ou les masses paranucléolaires Feulgen positives avec la membrane nucléaire. Ce dernier type de cellule germinale présente donc une certaine analogie avec la cellule germinale à noyau réticulé^{3,4} de l'embryon de poulet. Le nucléole et surtout les amas de chromatine sont au contraire beaucoup plus volumineux que chez le poulet. Chez l'embryon de caille de 9 jours on voit apparaître dans la partie centrale du cortex ovarien entre les cellules germinales du type précédent les premières cellules germinales au stade préleptotène (Figure 4). Chez ces préméiocytes la membrane nucléaire est invisible ou a disparu comme il en est le cas chez le poulet. Des masses de chromatine Feulgen-positives de forme et de volume

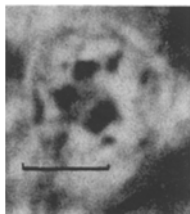


Fig. 1. Aspect d'une oogonie de caille japonaise en phase S prémitotique colorée au Feulgen «fastgreen», avant autoradiographie (échelle: 5 µm).

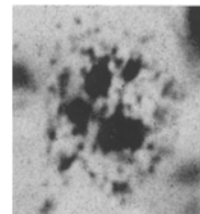


Fig. 2. L'oogonie de la Figure 1 après autoradiographie.

¹ M. CALLEBAUT, J. Embryol. exp. Morph. 18, 299 (1967).

² M. CALLEBAUT et J. BERNHEIM, Experientia 25, 978 (1969).

³ F. D'HOLLANDER, Archs Anat. microsc. 7, 117 (1904).

⁴ M. CALLEBAUT et R. DUBOIS, C.r. hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences, Paris 261, 12 (1965).