

Thiamin, Nalidixinsäure, Nystatin und Kaliumtellurit werden nach dem Autoklavieren (15 min bei 121°C) und Abkühlung auf etwa 50°C zugegeben.

L.m.-Stämme aller Serotypen wuchsen auf diesem Nährboden nach 2-3tägiger Bebrütung in kleinen schwarzen scharf begrenzten Kolonien. Andere in «Material und Methodik» angegebene Stämme sind nach 3tägiger Bebrütung nicht angewachsen. Bisher ist auf dem Substrat ausser *Listerien* nur ein Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* gewachsen.

3. Prüfung der Anwachsrate. Der prozentuale Anteil der Keime einer bestimmten Suspension, die auf dem geprüften Substrat im Vergleich zu einem Nichtselektiv-Nährboden anwächst – die Anwachsrate – wurde mit der Reinkultur von *L.m.* bestimmt. Die durchgeführten Versuche ergaben eine Anwachsrate von 50% gegenüber dem Blutagar.

4. Untersuchungen mit Stühlen. Auf dem Vergleichsnährboden – dem Tryptose-Agar mit Nalidixinsäure – wuchsen keine oder bis zu 10 *Listerien*kolonien und daneben massenhaft Begleitflora. Auf dem synthetischen Substrat sind dagegen alle *L.m.* Stämme in Reinkultur gewachsen.

Diskussion. Die epidemiologische und klinische Bedeutung des häufigen Vorkommens von *Listerien* im Darm (KAMPELMACHER et al.⁴) muss noch geklärt werden. Hierzu ist ein einfaches und zuverlässiges Kulturverfahren erforderlich. Zur Vermehrung der *Listerien* bei gleichzeitiger Unterdrückung des Wachstums der Stuhlflora kommt es z.B. bei niedrigen Temperaturen um 4°C. Diese Kälteanreicherung (GRAY et al.⁵) führt aber meistens erst nach einigen Monaten zum Erfolg.

Das Wachstum der grampositiven Keimarten – vor allem der Enterokokken – zu eliminieren war das Hauptproblem bei der Anwendung fester Substrate. Erst kürzlich haben RALOVICH et al.³ über gute Erfolge bei der Hemmung der grampositiven Keimarten mit Acridin-

dinfarbstoffen in Kombination mit Nalidixinsäure berichtet. BOCKEMÜHL et al.⁶ konnten mit Acridin-Kaliumthiocynaat-Agar und Acridin-Nalidixinsäure-Agar sowie auch KAMPELMACHER et al.⁷ mit Nalidixinsäuretryptanflavinagar diese Ergebnisse bestätigen.

Die Wachstumshemmung der Enterokokken auf dem beschriebenen Selektivsubstrat kann durch 2 Mechanismen erklärt werden. Nach MCCOY und WERDER⁸ benötigte *Streptococcus faecalis* zum Wachsen 11 Aminosäuren. Da das beschriebene Substrat nur 9 Aminosäuren enthält könnte dies die Ursache der Wachstumshemmung sein. Zum zweiten scheint auch der Vitaminbedarf der Enterokokken grösser als der von *Listerien* zu sein. Die meisten Enterokokkenstämme benötigen Biotin, Nikotinsäure, Riboflavin, Pantothersäure und Pyridoxin. *Streptococcus faecium* benötigt darüber hinaus noch Folsäure (DEIBEL⁹).

Die starke Beeinträchtigung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* auf dem synthetischen Substrat lässt sich ebenfalls durch einen Mangel an Nährstoffen erklären. FILDES et al.¹⁰ beschrieben das Wachstum von *St. aureus* in einer Lösung, die aus Salzen, Glukose, Thiamin, Nicotinsäure und 14 Aminosäuren bestand.

Mit dem synthetischen Mangelsubstrat ist also eine Hemmung der grampositiven Keimarten zu erzielen. Durch den Zusatz von Hemmstoffen gelang es auch die gramnegativen Keime zu unterdrücken.

Auf Grund dieser experimentellen Untersuchungen könnte sich das synthetische Selektiv-Substrat bei den Bemühungen um die Aufklärung der epidemiologischen und klinischen Bedeutung der Listeriose gut bewähren.¹¹

Summary. A synthetic Medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* is described. The experimental examination showed that in contrast to *Listeria* practically all the bacteria that appear physiologically in the organism do not grow this solid selective agar.

I. BRAVENY und R. GROTE

Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Technischen Universität, Ismaninger Strasse 22, D-8000 München 80 (Deutschland), 16 April 1973.

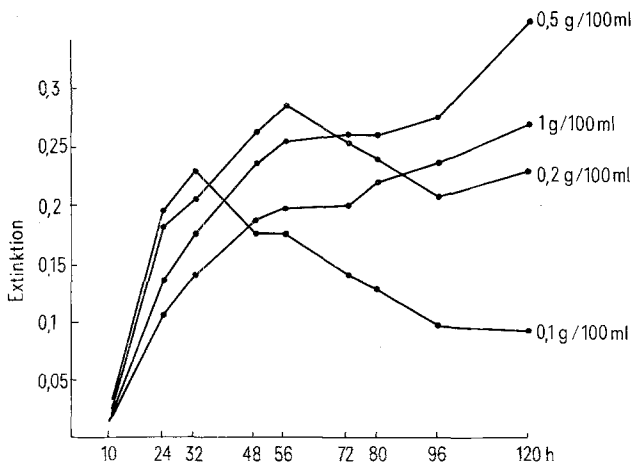


Fig. 3. Wachstumskurven von *L.m.* Serotyp 4b im Grundsubstrat bei verschiedenen Glukosekonzentrationen.

Chloroplasts of the Peel and the Internal Tissues of Apple-Fruits

We have reported earlier¹ that internal tissues of apple-fruits were capable of photosynthesis, i.e. producing oxygen under illumination. Indeed, the vascular bundles surrounding the ovary are pigmented green, even in a very mature fruit. The fact that these tissues are photosynthetically active suggests that viable chloroplasts must

be present. The present paper reports data obtained by the means of light and electron microscopy showing the occurrence of organized chloroplasts in internal tissues of apples.

¹ C. T. PHAN, Pl. Cell Physiol., Tokyo 11, 823 (1970).

- ⁴ E. H. KAMPELMACHER und L. M. VAN NOORLE JANSEN, Zentbl. Bakt. ParasitKde., I. Abt. Orig. A 221, 353 (1969).
- ⁵ M. L. GRAY, H. J. STAFSETH, F. THORP JR., L. B. SCHOLL und W. F. RILEY, J. Bact. 55, 471 (1948).
- ⁶ J. BOCKEMÜHL, H. P. R. SEELIGER und R. KATHKE, Z. med. Microbiol. Immunol. 157, 84 (1971).
- ⁷ E. H. KAMPELMACHER und L. M. VAN NOORLE JANSEN, Zentbl. Bakt. ParasitKde., I. Abt. Orig. A 221, 139 (1972).
- ⁸ T. A. MCCOY und S. H. WERDER, J. Bact. 65, 660 (1953).
- ⁹ R. H. DEIBEL, Bact. Rev. 28, 330 (1964).
- ¹⁰ P. FILDES, F. M. RICHARDSON, B. KNIGHT und G. P. GLADSTONE, Br. J. exp. Pathol. 17, 481 (1936).
- ¹¹ Auszugsweise auf der 4. Arbeitstagung der DGHM am 4. 10. 1972 in Mainz vorgetragen.



Fig. 1. Chloroplast of internal tissues of a mature Newtown apple. L, parallel lamellae (without grana, starch); M, endocytotic inclusion of a microbody in the chloroplast.



Fig. 3. Chloroplast of discs of internal tissues of a maturational Newtown apple, maintained 3 days in light. V, vesicles; F, ferritin network.

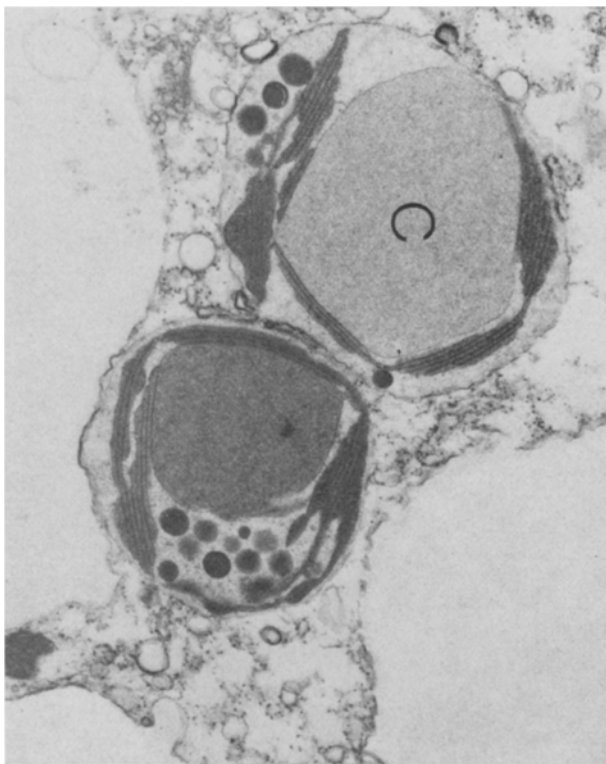


Fig. 2. Chloroplasts of internal tissues of a mature Newtown apple. C, crystalloid surrounded by lamellae.

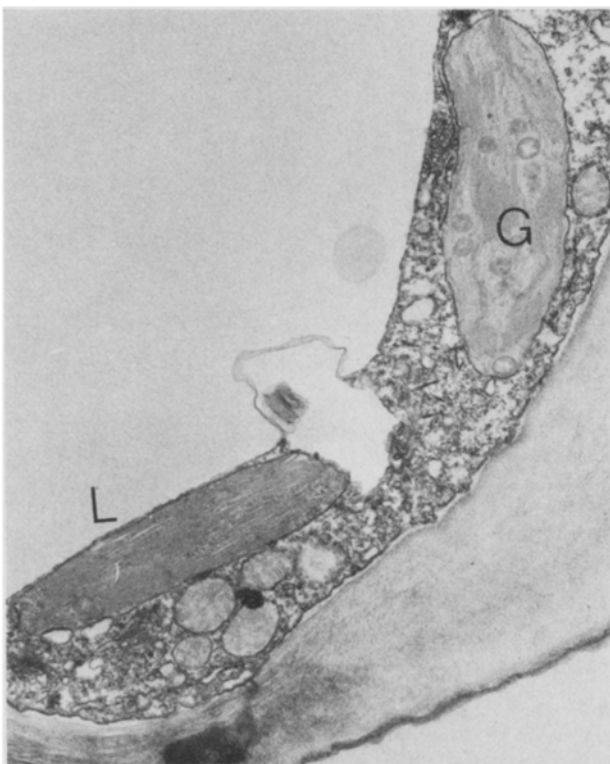


Fig. 4. Chloroplasts of discs of internal tissues of a mature Newtown apple, maintained 1 week in light. G, grana-structured chloroplast; L, lamellar-structured chloroplast.

Materials and methods. The apples used were mainly of the variety Newton and occasionally of the variety McIntosh. They were either purchased from commercial stores or graciously provided by the Canada Department of Agriculture Research Center in Summerland (B.C.). They were stored at 4°C, in the dark, until time of assay.

For light as well as electron microscopy, an apple was cut from stem to cavity into 2 halves. Pieces (2 to 4 mm wide) of internal tissues were taken from areas around the vascular bundles and also from the peel, for comparison. They were either fixed in a mixture of formaldehyde and glutaraldehyde, or sliced immediately and mounted on glass-slides in a 2% solution of ascorbic acid (to prevent browning) for fresh-tissue observation. For light microscopy, the fixed tissues were embedded in Tissuemat (Fisher certified m.p. 56.5°C), sectioned (usual thickness: 10 µm), freed from the embedding mixture, then either left unstained or stained with crystal violet, which is adsorbed by membranes and more strongly by chloroplasts to give a deep purple color^{2,3} or by iodine, which stains starch granules in blue and chloroplasts in brown³. For electron microscopy, the fixed material was treated with osmium tetroxide, then stained by lead acetate. The instrument used was Phillips 200.

Results. Occurrence of the chloroplasts in the internal tissues. Light microscopic observation showed that, in a mature apple-fruit, only 5 or 6 layers of cells under the epidermis have chloroplasts. The subjacent parenchyma is devoid of these organelles. Then, as we go further toward the core of the fruit, the 4 or 5 layers surrounding the vascular bundles, and the sieve-tube cells contain chloroplasts. In a mature fruit, these are generally concentrated in dense clusters in a few cells, which lie generally next to xylem elements, and are narrow and long shape. At this stage of maturity the chloroplasts, which appear slightly green, are filled each with one large crystalloid element. When treated with iodine, they turn brown, and when stained with crystal violet, appear as a light purple halo around a highly refringent ovoid central core. In a less mature fruit, the chloroplasts are evenly distributed against the cell-walls. At this stage, they are mainly green, with small, lens-shaped starch granules. In a fruit tending towards its full ripening, chloroplasts of these two and intermediate stages can be found in one cell.

Structures of apple chloroplasts. Chloroplasts of peel tissues are generally small, avoid-shaped, and densely green. Under the electron microscope, they exhibit the typical structure, with many grana, and several starch granules among the thylakoids. Chloroplasts of the internal tissues are much larger, generally flattened and elongated, with only parallel lamellae and no grana (Figure 1). They are usually devoid of starch granules. Very often a large crystalloid element occupies their center or part of their volume, the lamellae are then distributed around it, in parallel arrays (Figure 2). In

Figure 1, there is also indication of endocytotic inclusion of microbodies in the chloroplasts of these internal tissues.

Viability of the chloroplasts of internal tissues. The activity of the chloroplasts of internal tissues of apple-fruits has been reported previously¹. When discs of the internal tissues were 'maintained' on an agar medium, in light, they became greener, and their photosynthetic ability increased with time. This regain of activity was corroborated by microscopic observations. Light microscopy showed that discs 'maintained' for 4 days had 20 to 50 times more chloroplasts than when they have just been cut out of the fruit. In chloroplasts of pieces of apples that had been cut and exposed to light, electron microscopy evidenced vesiculation of the lamellae (Figure 3) and eventually grana formation (Figure 4).

Conclusion. From the results obtained with electron microscope observation it is tempting to suggest that there are 2 types of chloroplasts in the apple-fruits, and to relate them to the 2 types of chloroplasts found in the mesophyll and in the bundle sheath of C₄-carboxylic acid photosynthetic plants. But our latest observation confirmed the presence of starch granules in both types of chloroplasts. Furthermore, the presence of a grana-type chloroplast beside a lamella-type in the same cell of an illuminated 'maintained' disc as well as the endocytotic figures⁴ made us now think that the internal chloroplasts should be considered as partially etiolated chloroplasts. We have given the proof¹ that some light could penetrate into the core of an apple-fruit. This light must be responsible for the remaining lamellar structure of the internal chloroplasts.

Résumé. Des observations faites en microscopies lumineuse et électronique mettent en évidence la présence de chloroplastes dans les tissus internes des pommes, notamment dans les faisceaux vasculaires répartis autour des loges carpellaires. Ces chloroplastes internes ont un système lamellaire parallèle sans grana, tandis que ceux de la pelure ont une structure granaire développée. Il ne semble cependant pas qu'il s'agisse de deux lignées différentes de chloroplastes; les chloroplastes internes seraient plutôt partiellement étiolés.

C. T. PHAN⁵

Department of Plant Science,
University of Alberta,
Edmonton (Alberta, Canada, T6G 2E1), 6 July 1973.

² D. A. JOHANSEN, *Plant Microtechnique* (McGraw-Hill, New York 1940).

³ E. STRASBURGER, *Handbook of Practical Botany* (George Allen and Co., London 1911).

⁴ S. JHAMB, Ph. D. Dissertation, University of Alberta Canada (1973).

⁵ Acknowledgment. I wish to thank Miss M. A. KLYNE for her help in light microscopy, and Mrs I. KARAS for her competent assistance in electron microscopy.

Der Einfluss von Tetracyclin auf die Vermehrung des Kartoffel-Blattrollvirus im Vektor *Myzus persicae*

In der Speicheldrüse von *Myzus persicae* wurden Volumenverdoppelungen der Zellkerne vom A- und F-Typ beobachtet, wenn die Blattläuse an *Physalis floridana*-Pflanzen gehalten wurden, die mit dem Kartoffel-Blattrollvirus (potato leafroll virus, PLRV) infiziert waren (WEIDEMANN¹). Da Kernschwellungen und Stoffwechselaktivität der Zelle in enger Beziehung stehen, lag die Ver-

mutung nahe, dass diese Kernvergrößerungen mit der Virusvermehrung im Vektor zusammenhängen. Um darüber sowie über mögliche Zusammenhänge von Kernschwellungen und Übertragbarkeit des PLRV Aufschlüsse zu erhalten, wurden in den vorliegenden Untersuchungen

¹ H. L. WEIDEMANN, *Entomologia exp. appl.* 14, 161 (1971).