

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).

die Blattläuse mit Tetracyclinhydrochlorid behandelt, um den Zellstoffwechsel zu beeinflussen. Tetracycline gelten als Inhibitoren der Proteinsynthese (HASH²). Nach den Behandlungen wurden mit diesen Blattläusen Übertragungsversuche durchgeführt sowie Zellkerne in der Speicheldrüse vermessen.

Die Übertragungsversuche enthielten zwei Versuchsreihen mit unterschiedlicher Fragestellung. In der ersten sollte geprüft werden, inwieweit wiederholte Tetracyclinbehandlungen die Virusübertragung überhaupt beeinflussen können, und in der zweiten die Dauer der Wirksamkeit bei einer einmaligen Behandlung.

Material und Methode. Die Blattläuse befanden sich stets auf *Physalis floridana*, die sowohl als Futterpflanze als auch als Virusquelle und Testpflanze verwendet wurde. Für die erste Versuchsreihe wurden die Blattläuse an vier aufeinanderfolgenden Tagen täglich einmal auf der Virusquelle mit Tetracyclinhydrochlorid-Lösung (Hostacyclin, Fa. Hoechst, Frankfurt a. M.) besprüht, und zwar in den Konzentrationen: 0,013 % und 0,050 % in Leitungswasser. Zur Kontrolle diente Leitungswasser, das mit 0,1 N HCl auf den pH-Wert einer 0,013 %igen Lösung (pH 4,4) eingestellt wurde. Von den behandelten Pflanzen wurden nach dem ersten Tag in täglichem Abstand jeweils 5 Blattläuse zur Prüfung ihrer Übertragungsfähigkeit auf gesunde *P. floridana* (4–6-Blattstadium) gesetzt sowie weitere *M. persicae* für die histologische Untersuchung vorbereitet. Bei der zweiten Versuchsreihe wurde ebenso verfahren, die Blattläuse jedoch nur einmal behandelt. Die Summe der Virusaufnahme und -abgabezeit betrug einheitlich 6 Tage. Bonitiert wurden die Pflanzen nach 4–6 Wochen. Die histologische Verarbeitung und die Auswertung der Zellkernmessungen wurden schon früher beschrieben (WEIDEMANN³). In diesem Fall wurden die

annähernd kreisrunden Flächen der Zellkerne mit dem Teilchengrößenanalysator TGZ 3 (Fa. Zeiss) bestimmt und daraus die Volumina errechnet.

Resultate und Diskussion. Hinsichtlich der verwendeten Hostacyclinkonzentrationen ergaben sich keine Unterschiede; die Werte wurden deshalb zusammengefasst. Die Figur 1a zeigt die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe. Man ersieht, dass nach einmaliger Behandlung die Übertragungsrate nur geringfügig reduziert war. Bei wiederholten Behandlungen lag der Anteil der infizierten Pflanzen jedoch deutlich unter dem der Kontrolle ($p < 0,001$). Die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe in Figur 1b zeigen, dass diese Einschränkung der Übertragbarkeit nur durch

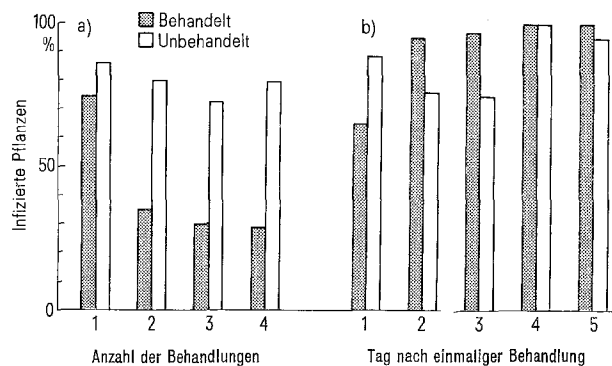


Fig. 1. a) Übertragung des PLRV durch *M. persicae* nach wiederholter Behandlung mit Hostacyclin. 100% = 65 Pflanzen. b) Übertragung des PLRV nach einmaliger Behandlung mit Hostacyclin. 100% = 50 Pflanzen.

Mittlere Volumina von Speicheldrüsenkernen in μm^3

Kerntyp	Behandelt	Kontrolle	Anzahl Kerne/Drüse
A/F	1046	857/2072	12
B	438	460	4
C	1141	1169	2

Anzahl der vermessenen Speicheldrüsen $\pm$: Behandelt: 256; Kontrolle: 128. 3-facher mittlerer Fehler des Mittelwertes bei den Einzelauswertungen (je 32 Drüsen) max. $\pm 40 \mu\text{m}^3$.

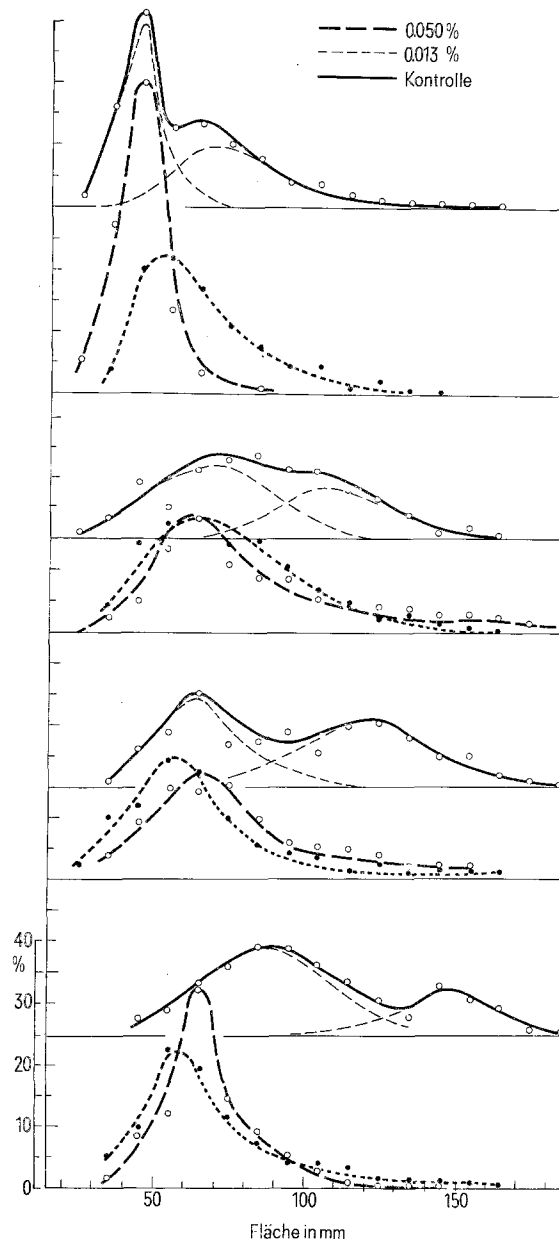


Fig. 2. Größenverteilungen von Zellkernen des Typs A in Speicheldrüsen von *Myzus persicae* nach 1- bis 4-maliger Behandlung mit Hostacyclin. Abszisse: gemessene Fläche im Masstab 770:1.

² D. H. HASH, A. Rev. Pharmac. 12, 35 (1972).

³ H. L. WEIDEMANN, Entomologia exp. appl. 14, 107 (1971).

wiederholte Behandlung zustande kam. Bei einmaliger Behandlung war die Übertragbarkeit nur nach dem ersten Tag schwach herabgesetzt ($p < 0,005$), später entsprach sie der Kontrolle oder lag noch darüber.

Die Grössenverteilungen der Speicheldrüsenkerne vom A-Typ in Figur 2 sind bei der Kontrollgruppe (ausgezogene Linie) zweigipfelig, bei den behandelten Blattläusen dagegen stets eingipfelig. Die Hostacyclinbehandlungen haben demnach die Kernschwellungen und damit die Bildung des zweiten Teilkollektivs verhindert. Beide verwendeten Hostacyclinkonzentrationen zeigten darin kaum Unterschiede. Die Verteilungskurven der F-Zellkerne entsprachen denen des A-Typs. Es ist nach den bisherigen Ergebnissen auch anzunehmen, dass beide einem Zelltyp zuzuordnen sind (PONSEN⁴). In der Tabelle sind die errechneten Volumina aller Messungen vom A- und F-Typ gemittelt. Von beiden Teilkollektiven der Kontrolle ist nur das erste mit den Volumina der behandelten Blattläuse vergleichbar, das zweite, das etwa 50 % der Messungen enthält, beinhaltet Kerne mit etwa doppelten Volumina. Daneben wurden Zellkerne vom B- und C-Typ vermessen, die nach Aufenthalt der Blattläuse auf der Virusquelle keine Kernschwellungen zeigten. Ihre Volumina blieben auch durch die Hostacyclinbehandlung unbeeinflusst.

Insgesamt ergab sich, dass Schwellungen bestimmter Speicheldrüsenkerne, die durch Saugen der Blattläuse an PLRV-infizierten *P. floricola* hervorgerufen wurden, durch Tetracyclinbehandlungen unterdrückt wurden. Daneben wurde die Fähigkeit der Blattläuse, das PLRV zu übertragen, eingeschränkt. Es liegt deshalb nahe, zwischen beiden Ergebnissen einen Zusammenhang an-

zunehmen und Kernschwellungen der A/F-Zellen mit der Virusübertragung und damit möglicherweise mit der Virussynthese in Verbindung zu bringen. Allerdings wurde die Übertragungsfähigkeit der Blattläuse auch bei wiederholter Behandlung nicht völlig beeinträchtigt. Falls in den A/F-Zellen Virussynthese stattfindet, wird diese deshalb wohl nur in geringerem Masse zur PLRV-Produktion im Vektor beitragen, während andere Organe, die möglicherweise weniger von Tetracyclin beeinflusst werden, grössere Bedeutung haben. Nach neueren Ergebnissen (PONSEN⁴) kommen für die PLRV-Vermehrungen auch die Fettkörperzellen in Frage. Es ist deshalb zu vermuten, dass die Virusproduktion dieser oder anderer Zellen dazu beigetragen hat, die Übertragungsfähigkeit der behandelten Blattläuse teilweise zu erhalten.

Summary. Tetracycline hydrochloride treatment decreased the transmission rate of potato leafroll virus (PLRV) by *Myzus persicae*. It also prevented the PLRV-induced swellings of the A/F nuclei of the salivary gland. Apparently there is a connection between these two phenomena. The A/F cells may be a site of virus multiplication.

H. L. WEIDEMANN

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für landwirtschaftliche Virusforschung, Messeweg 11/12, D-33 Braunschweig (Deutschland), 18. Juli 1973.

⁴ M. B. PONSEN, Meded. Landboges. Wageningen 72, (16)144(1972).

On the Mechanism of the Inhibitory Action of 2-Amino-4,6-Dichloropyrimidine on Poliovirus Growth

We have reported previously that 2-amino-4,6-dichloropyrimidine (Py 11) prevents poliovirus 1 growth by impairing the ability of capsid precursors to organize virus particles¹. The research here referred to has been carried out to investigate the irreversibility of this effect and, through the antagonism exerted on it by metabolic precursors, to shed some light on the mechanism of the antiviral action.

Materials and methods. Are mostly the same as previously described¹. L- and D-aminoacids and metabolic

precursors of nucleic acids were furnished by BDH and Merck.

Results. Data in Table I show that as little as 1 h incubation of HEp2 cell cultures under a thin layer of drug containing Hank's BSS medium is enough to impair irreversibly the ability of cells to produce infectious virus and, on the other hand, to deprive the medium of

¹ A. M. MARCIALIS, M. L. SCHIVO, P. UCCHEDDU, A. GARZIA and B. LODDO, *Experientia*, submitted for publication.

Table I. Intracellular incorporation of antiviral amounts of Py 11

A	B	C	D
Py 11 ($\mu\text{g/ml}$)	PFU produced by cells incubated in Py 11 media $\times 1$ h and then in a drug-free medium for 11 h	PFU produced by cells incubated $\times 12$ h in the Py 11 media already used to incubate cells B	PFU produced by cells incubated $\times 12$ h in extracts obtained from drug-treated cells B
60	10^4	8.2×10^6	6.1×10^6
30	8×10^6	2.1×10^7	9.5×10^6
15	1.5×10^7	1.6×10^7	2.1×10^7
—	1.2×10^7	1.8×10^7	1.4×10^7

5×10^7 HEp 2 cell monolayers were infected $\times 1$ h at 4°C with 50 PFU/cell of poliovirus 1 Brunenders, washed 3 times in Hank's BBS and incubated at $37^\circ\text{C} \times 1$ h under a thin layer (1 mm deep) of the Py 11 media listed in A. The cultures were treated as follows: 10^6 cell samples were washed in Hank's BBS and reincubated at 37°C in a drug-free medium (B); the drug-medium was recovered and used again for incubating new infected cells (10^6 cells/sample) (C); the treated cells were frozen and thawed 3 times. The extracts thus obtained were used as maintenance media for incubating new infected 10^6 cells/sample (D).