

(0.66 M) buffer, pH 4.6, 1500 V, 1.5 h). The zone on the electrophoresis paper corresponding to authentic ACh was cut and eluted with 1 ml of 0.1 M NaH₂PO₄ buffer. Gas chromatography of the eluate yielded a peak with the same retention time as authentic ACh. These data provide evidence for the authenticity of the compound in the plants as ACh. No other choline ester among the lower homologues of ACh (propionyl-, butyryl-, valerylcholine) was found in these plants. Quantitative estimations were performed by gas chromatography without prior electrophoresis.

Results and discussion. ACh could be detected in all plants tested (Table). Thus it is possible that ACh occurs ubiquitously in the plant kingdom. The different plant organs, such as leaves, stem, roots showed various endogenous amounts of ACh, but the root system always contained less ACh than the shoot. As can be seen from the Table, ACh was not detected in etiolated seedlings. In

ACh content of higher plants

Plant	ACh (nmol/g fresh weight)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	
stem	7.4 ± 1.7 (7)
leaves	2.0 ± 0.6 (7)
roots	0.4 (1)
<i>Pisum sativum</i> (light grown)	
shoot	8.2 ± 1.0 (10)
roots	1.4 ± 0.2 (3)
<i>Pisum sativum</i> (etiolated)	
shoot	nil (< 0.01) (2)
roots	nil (< 0.01) (2)
<i>Sinapis alba</i> (light grown)	
shoot	1.8 ± 0.4 (5)
<i>Sinapis alba</i> (etiolated)	
shoot	nil (< 0.01) (2)
<i>Cucurbita pepo</i>	
shoot	10.5 ± 0.9 (8)
roots	3.3 ± 0.3 (6)
<i>Helianthus annuus</i>	
shoot	7.9 ± 2.0 (9)
roots	3.5 (1)
<i>Spinacea oleracea</i>	
shoot	6.8 ± 0.7 (6)
<i>Amaranthus caudatus</i>	
shoot	3.1 ± 0.4 (4)

Results are mean ± SEM of the number of ACh determinations in parentheses. The lower limit of sensitivity of the method was about 0.10 nmol of ACh, which is equivalent to 0.01 nmol/g fresh weight of plant tissue.

another series of experiments, the effect of light intensity on the ACh concentration in peas (*Pisum sativum* L.) was investigated. After having grown in white light of an intensity of 7.5 J/m²/sec, these plants contained much less ACh (1.5 nmol/g) than peas that had grown under normal light conditions (31 J/m²/sec). In this particular experiment, the quantitative result obtained by gas chromatography was compared with that obtained by bioassay. The eluate from electrophoresis was assayed on the rat blood pressure⁵. There was no difference between the ACh concentration as estimated by gas chromatography or by bioassay (1.9 nmol/g). Our findings are in keeping with the previous observation that light has a regulatory effect on the ACh levels in plants².

JAFFE³, YUNGHANS and JAFFE⁶ suggested that ACh may act as a permeability regulator or as a local hormone, both in plants and in animals. The questions as to the site of synthesis and function of ACh in plants remain obscure⁷⁻¹⁰. The effect of light might be to increase the rate of synthesis of ACh, possibly by activating the enzymes responsible for biosynthesis.

The answer to this question depends on a better understanding of how biosynthesis of ACh occurs in plants. A basis for interpretation is information, essentially biochemical in nature, about the enzyme of synthesis, its properties and intracellular location and its functional behaviour in relation to other metabolic systems of the plant cell¹¹.

Zusammenfassung. Der ACh-Gehalt verschiedener höherer Pflanzen wurde mit einer gaschromatographischen Methode bestimmt. Die Identifizierung des in den Pflanzen vorkommenden ACh erfolgte durch hochspannungselektrophoretische Auftrennung des pflanzlichen Extraktes und nachfolgender Gas-Chromatographie. Der Spross enthält mehr ACh als die Wurzel. In etiolierten Pflanzen war kein ACh nachweisbar. Es wird vermutet, dass der endogene ACh-Gehalt durch Licht reguliert wird.

E. HARTMANN and H. KILBINGER

Institut für Allgemeine Botanik der Universität, Saarstrasse 21, D-65 Mainz (German Federal Republic, BRD); and Pharmakologisches Institut der Universität, Obere Zahlbacherstrasse 67, D-65 Mainz (German Federal Republic, BRD), 19 August 1974.

⁵ D. W. STRAUGHAN, *J. Pharm. Pharmacol.* 10, 783 (1958).

⁶ H. YUNGHANS and M. J. JAFFE, *Pl. Physiol.* 49, 1 (1972).

⁷ E. HARTMANN, *Z. Pflanzenphysiol.* 71, 349 (1974).

⁸ H. KASEMIR and H. MOHR, *Pl. Physiol.* 49, 453 (1972).

⁹ R. L. SATTER, P. B. APPLEWHITE and A. W. GALSTON, *Pl. Physiol.* 50, 523 (1972).

¹⁰ T. TANADA, *Pl. Physiol.* 49, 860 (1972).

¹¹ We wish to thank Mrs. U. KNÜPPEL and Miss A. MUTH for skilful technical assistance. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Sur les relations entre la production d'hexosamines et d'hydroxyproline de la part de fibroblastes cultivés in vitro dans différentes concentrations d'O₂

Le collagène, associé aux mucopolysaccharides, constitue le composant le plus important de la substance intercellulaire et des différents types de tissus conjonctifs. Ces deux substances sont produites principalement par les fibroblastes.

Dans des travaux précédents, nous avons étudié la morphologie, l'activité enzymatique, le métabolisme du DNA et la production d'hexosamines de la part des fibroblastes cultivés in vitro en différentes concentrations d'O₂¹⁻⁴. Il nous a paru intéressant d'étudier dans les

mêmes conditions expérimentales les relations qui existent entre la production des hexosamines et de l'hydroxyproline; ces métabolites ont en effet une importance fondamentale pour le tissu conjonctif.

On a cultivé des fibroblastes d'embryon de poulet de 9 jours (500 000 cellules/ml) pendant 3 jours dans le milieu suivant: TC 199 (Difco) 90%, sérum de cheval 10%. On remplace ensuite le milieu par du TC Eagle (Difco), et les cultures sont mises dans des atmosphères gazeuses contenant les concentrations d'O₂ suivantes: 80%, 20%, 7%, 5%, 2% et anoxie. Le pourcentage de CO₂ est identique pour toutes les atmosphères gazeuses: 5%. On complète à 100% chaque atmosphère gazeuse avec du N₂ (Carba, 99,99%). Les cellules vivent dans ces différentes concentrations d'O₂ pendant 3 jours; ensuite

le milieu est prélevé et lyophilisé, les cellules sont aussi prélevées et centrifugées pendant 10 min à 3000 tours/min. Les hexosamines et l'hydroxyproline sont déterminées séparément dans le milieu et dans les cellules; les premières selon la méthode de BOAS⁵, la seconde selon la méthode de NEUMAN et al.⁶. On a aussi suivi la production des mucopolysaccharides sulfatés en incubant les cellules, à la fin de la période expérimentale, à 37 °C pendant 1 h, avec 0,5 µCi de Na₂³⁵SO₄ par ml de milieu, selon la méthode décrite précédemment (Gotzos et al.⁷).

Le graphique A de la Figure 1 montre que la plus grande quantité d'hexosamines a été trouvée dans les cellules maintenues dans une atmosphère de 5% d'O₂, la plus basse dans celles maintenues dans 80% d'O₂. A la concentration de 7% et 20% d'O₂, la quantité d'hexosamines diminue de manière significative par rapport à celle de 5% d'O₂; cette diminution est moins importante que celle observée pour les cellules maintenues dans une atmosphère de 2% d'O₂. La quantité d'hydroxyproline des cellules augmente avec l'augmentation de la concentration d'O₂ jusqu'à 20% (Figure 1, B); mais dans la forte hyperoxie (80% d'O₂), elle diminue par rapport à celle des cellules cultivées en présence de 5%, 7% et 20% d'O₂. Dans le milieu de culture (Figure 1, C), comme dans les cellules, la plus grande quantité d'hexosamines a été trouvée à la concentration de 5% d'O₂. A la concentration de 2% d'O₂, les hexosamines du milieu sont en quantité inférieure à celles de 5% d'O₂, mais supérieure à celles de 7% et 20% d'O₂. Ce résultat est l'inverse de ce qu'on a trouvé pour les cellules. Nous pensons qu'il s'agit là d'une contradiction apparente des résultats. Elle peut s'expliquer, à notre avis, en admettant que la condition de très forte hypoxie au niveau cellulaire est plus difficile à se réaliser et demande un laps de temps plus long. A la concentration de 80% d'O₂, la quantité d'hexosamines diminue de manière significative par rapport à toutes les autres concentrations d'O₂. La quantité d'hydroxyproline dans le milieu de culture aux différentes concentrations d'O₂ (Figure 1, D) montre le même comportement que celui trouvé dans les cellules: elle augmente avec l'augmentation de la concentration d'O₂ jusqu'à 20%; dans une forte hyperoxie (80% d'O₂), elle diminue légèrement. En ce qui concerne l'incorporation du ³⁵SO₄, à savoir la synthèse des mucopolysaccharides sulfatés (MPS-sulfatés), les cellules montrent que leur capacité optimale de synthèse se situe à la concentration de 5% d'O₂ (Figure 2). Entre les conditions expérimentales d'hyperoxie (80% d'O₂) et d'anoxie, on ne note pas de différence significative; mais dans ces 2 conditions la synthèse est fortement réduite. A la concentration de 20% d'O₂, les fibroblastes possèdent également une bonne capacité de synthèse.

Ces résultats nous montrent que l'optimum de la production des hexosamines ne concorde pas avec celui de l'hydroxyproline en rapport avec les différentes concentrations d'O₂. En effet la meilleure production des hexosamines a lieu à la concentration de 5% d'O₂, et leur

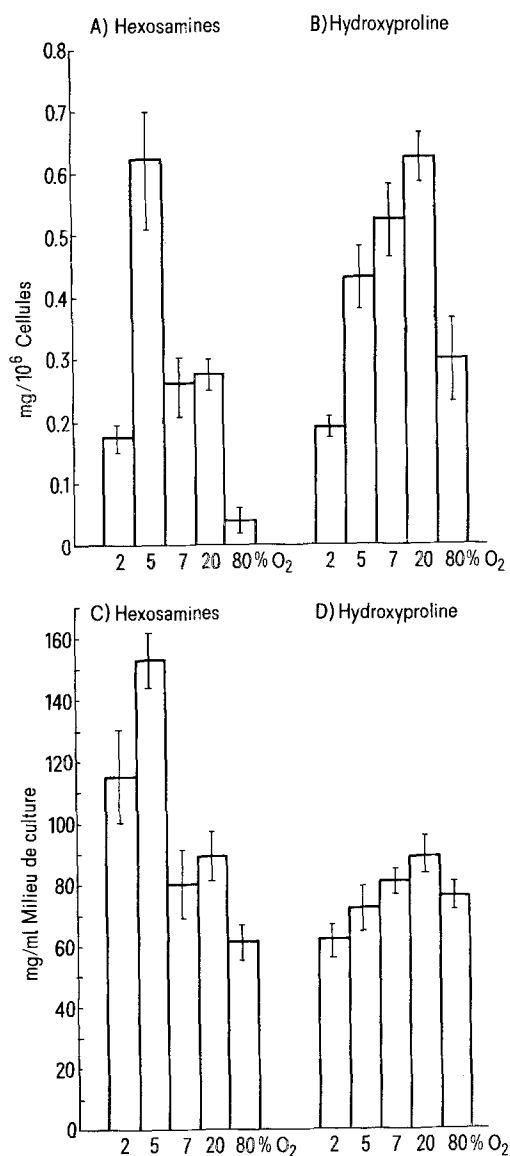


Fig. 1. Quantités d'hexosamines et d'hydroxyproline trouvées dans les cellules (A et B) et dans le milieu de culture (C et D), exprimées respectivement, en mg par million de cellules et en mg par ml de milieu de culture. Chaque colonne correspond à la moyenne des valeurs trouvées pour chaque concentration d'oxygène (2%, 5%, 7%, 20%, 80%).

¹ Cs. HADHAZY, G. CONTI, A. SPRECA, J. P. MUSY, B. CAPPELLI-GOTZOS et V. GOTZOS, *Acta anat.* 78, 362 (1971).

² B. CAPPELLI-GOTZOS, Cs. HADHAZY, V. GOTZOS, A. SPRECA, J. P. MUSY et G. CONTI, *Annls Histochem.* 16, 81 (1971).

³ J. P. MUSY, Cs. HADHAZY, A. SPRECA, V. GOTZOS, B. CAPPELLI-GOTZOS, G. CONTI, *Archs Biol., Liège* 83, 67 (1972).

⁴ Cs. HADHAZY, EVA H. OLAH, A. SPRECA, V. GOTZOS, J. P. MUSY, B. CAPPELLI-GOTZOS et G. CONTI, *Acta biol. hung.* 24, 65 (1973).

⁵ N. F. BOAS, *J. biol. Chem.* 204, 553 (1953).

⁶ R. E. NEUMAN et M. A. LOGAN, *J. biol. Chem.* 184, 299 (1950).

⁷ V. GOTZOS, L. MODIS, B. CAPPELLI-GOTZOS et G. CONTI, *Histochemie* 33, 129 (1973).

production est moins touchée dans des conditions d'hypoxie très poussée (2% d'O₂) que dans celles de très forte hyperoxie (80% d'O₂). Ce n'est pas le cas pour l'hydroxyproline: nous avons l'optimum de sa production à la concentration de 20% d'O₂, et la forte hyperoxie (80% d'O₂) se révèle moins nocive que l'hypoxie très poussée (2% d'O₂).

Sur la base de ces résultats, on peut conclure que la production d'hydroxyproline nécessite une quantité d'O₂ supérieure à celle des hexosamines. Ces dernières peuvent participer à la formation des différentes macromolécules

de la substance fondamentale du tissu conjonctif (MPS acides sulfatés, MPS acides, glycoprotéines, etc.). Dans notre cas, si nous mettons en rapport la synthèse des MPS sulfatés avec la production des hexosamines, nous pouvons observer que les fibroblastes synthétisent in vitro des MPS sulfatés avec le même rythme à 5% et à 20% d'O₂, tandis que la production des hexosamines baisse fortement à des concentrations d'O₂ supérieures à 5%.

Cette donnée nous suggère l'hypothèse suivante: les hexosamines produites en grande quantité à 5% d'O₂ ne sont pas celles des MPS sulfatés, mais des hexosamines liées à d'autres substances (MPS acides, glycoprotéines, etc.).

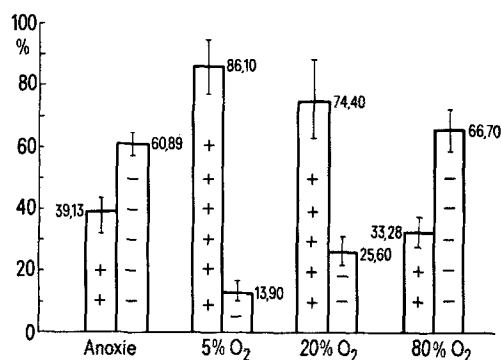


Fig. 2. Pourcentage de cellules marquées (+) et non marquées (—) par le ³⁵S0₄ dans les cultures de fibroblastes cultivés en différentes concentrations d'oxygène (5%, 20%, 80%) et en anoxie.

Summary. Studies and comparison of the hexosamine and hydroxyprolin production by fibroblasts cultivated in vitro at different oxygen concentrations. The results show that the highest hexosamine production occurs at a low oxygen concentration (5%). The highest hydroxyprolin production occurs at 20% O₂; this oxygen concentration is considered as an hyperoxic one for fibroblasts cultivated in vitro. Besides it has been ascertained that the highest sulphated MPS production occurs between 5 and 20% oxygen without any significant variation.

V. GOTZOS, M. LASZLO B. et B. CAPPELLI-GOTZOS

Institut d'Histologie et d'Embryologie générale de l'Université de Fribourg, CH-1700 Fribourg (Suisse), 1 juillet 1974.

Morphological Aspects of the Nuclei in Mature Articulated Laticifers of *Calystegia soldanella*

A salient characteristic of articulated laticifers is the development of a multinucleate protoplast from a chain of longitudinal cells whose transverse walls are either partially or completely resorbed. The functional significance of these coenocytic structures, characterized by internal secretion, is still unknown, even though numerous studies dealing with the fine structure and the composition of the latex have been conducted¹⁻⁵. The morphological aspect of the nuclei during the differentiation of the articulated laticifers is poorly understood, on the one hand because of the limited research on this subject and on the other hand because of the considerable technical difficulties involved in fixation and staining. It has been observed, however, that in *Taraxacum kok-saghyz*, the number and size of the nuclei vary according to the age of the tissue⁶, and that in the laticifers of the secondary stem of *Hevea brasiliensis* and of *Manihot glazovii*, the nuclei undergo a degenerative process following nucleolar extrusion^{7, 8}.

Based upon these indications, the purpose of this study is to contribute, using recently acquired techniques of embedding and staining, to the knowledge of the morphological aspects of the nuclei contained in the syncytial mature laticifers of *C. soldanella*.

Segments of the second internode of young stems of *Calystegia soldanella* R. Br. (Convolvulaceae), 5 mm long, were fixed in 10% neutral formalin for 24 h and then embedded in a methyl-butylmethacrylate mixture. The longitudinal sections in sets, 7 μm thick, which were cut using a LKB Pyramitome were hydrated by means of a decreasing alcoholic series and then were placed in a citric acid-NaHPO₄ buffer solution (pH 4.1; 0.06 M) for

5 min. Next the sections were stained for 15 min with acridine orange (AO), dissolved at a concentration of 10⁻⁴ M in the buffered solution. After a rapid dehydration in tertiary butyl alcohol, the sections were embedded in a non-fluorescent medium (Entellan, Merck). The use of acridine orange as a fluorochrome is justified because of its demonstrated rapidity in absorption, its intense chromatism even at low concentration, and its specific characteristic of linking with nucleic acids⁹⁻¹². The use of this dye is particularly interesting in laticifer studies because it offers, at the same time, the possibility to stain the cell wall also, therefore permitting an absolute

¹ A. FREY-WYSSLING, *Monographien aus dem Gesamtgebiet der Physiologie der Pflanzen und der Tiere* (J. Springer, Berlin 1935), vol. 32.

² W. A. SOUTHOORN, *Nature*, Lond. 188, 165 (1960).

³ E. H. ANDREWS and P. B. DICKENSON, *Natn. Rubber Res. Conf. Proc.* 1961, 756 (1961).

⁴ F. R. MILANEZ, B. JANS and R. RICKENBACHER, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 167, 447 (1970).

⁵ A. THURESON-KLEIN, *Ann. Bot.* 34, 751 (1970).

⁶ I. BLOKHINTSEVA, *Bull. Acad. Sci. URSS Sci. Biol.* 4, 608 (1940).

⁷ F. R. MILANEZ, *Archos Serv. flor.* 2, 39 (1946).

⁸ F. R. MILANEZ, *Lilloa* 16, 193 (1949).

⁹ L. VON BERTALANFFY and I. BICKIS, *J. Histochem. Cytochem.* 4, 481 (1956).

¹⁰ L. VON BERTALANFFY, F. MASIN and M. MASIN, *Cancer* 11, 873 (1958).

¹¹ D. F. BRADLEY and M. K. WOLF, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 45, 944 (1959).

¹² R. RIGLER JR., *Acta physiol. scand.* 67, Suppl. 267 (1966).