

De celloidine-microtoomtechniek toegepast op het anatomisch onderzoek van houtgewassen, door H. A. A. van der Lek.

INLEIDING

Voor het inzicht in de levensverrichtingen der plantenorganen is een nauwkeurige kennis van hun bouw van het grootste gewicht. Dit is een zeer eenvoudige waarheid: het spreekt van zelf, dat — wil men de verrichtingen van een werktuig verstaan — men zich zoo nauwkeurig mogelijk op de hoogte moet stellen van zijn constructie. Op de noodzakelijkheid van anatomisch onderzoek, in verband met physiologische waarnemingen, is dan ook reeds herhaaldelijk gewezen. Toch wordt deze eenvoudige waarheid maar al te vaak uit het oog verloren. Zelfs onderzoekers van beteekenis zien wij soms jaren lang met bepaalde objecten werken, zonder dat zij zich van den bouw er van zoo volkomen op de hoogte stellen, als de hulpmiddelen slechts toelaten. Zoo wees ik er vroeger reeds op, dat VOECHTING, die zich gedurende een groot deel van zijn leven bezig hield met de regeneratieverschijnselen bij wilgestekken, zich nooit ook maar eenigszins nauwkeurig van hun anatomischen bouw op de hoogte heeft gesteld.

Ten deele is dit wellicht hieraan toe te schrijven, dat bij velen, min of meer bewust, het denkbeeld schijnt te bestaan, dat de microscopische bouw der planten thans vrijwel geheel bekend is; ten deele misschien ook aan een zekeren afkeer van het minutieuse en geduld vereischende werk. Soms echter kan men den indruk niet van zich afzetten, dat dit werk als eenigszins minderwaardig beschouwd wordt en de biologie eerst „wetenschap” wordt, als natuur- en scheikunde (en wiskunde!) er aan te pas komen.

Een enkel voorbeeld ter demonstratie: P. W. ZIMMERMAN (Vegetative propagation with special reference to cuttings; Proceedings of the Am. Soc. for Hort. Sc. 1925) vermeldt eenige gevallen (pag. 227), waarin bijwortels op regelmatige, vaste plaatsen optreden („Adventitious roots appear with great regularity about certain regions on the stem”) en zegt naar aanleiding van deze waarnemingen: „Microchemistry should prove valuable when response is localised.” Mij dunkt, men dient toch de microscopie aan de microchemie vooraf te laten gaan.

Dat de cytologie zich tot een afzonderlijke wetenschap heeft kunnen ontwikkelen en haar groote beteekenis heeft gekregen voor

de erfelijkheidsleer, is voor een groot deel toe te schrijven aan een tot groote volkomenheid opgevoerde microtoomtechniek.

De plantenanatomie heeft zich, sedert MALPIGHI en GREW er de grondslagen voor legden, geleidelijk ontwikkeld en als zuiver descriptieve wetenschap vormt zij thans een indrukwekkend geheel. Dit neemt niet weg, dat er ook in den microscopischen bouw der planten nog veel te onderzoeken valt. Waar het er om te doen is inzicht te krijgen in de levensverrichtingen, kunnen veelal de allerfijnste details van groote beteekenis zijn en men dient m. i. dan ook alle hulpmiddelen van de techniek aan te grijpen ten einde zoo ver mogelijk door te dringen. In de plantenanatomie zijn het uit den aard der zaak vooral de celwanden, in het bijzonder de sterk verdikte cellulosewanden — die bovendien vaak door chemische verandering en impraegnatie nog onhandelbaarder worden — die aan het fijnere histologische onderzoek groote moeilijkheden in den weg leggen. Deze moeilijkheden doen zich vooral gelden bij het onderzoek van houtige gewassen. Deze toch zijn opgebouwd, zoowel uit teere dunwandige elementen, als uit dikwandige (verhoute, verkurkte enz.) en op vele plaatsen bouwen beiderlei elementen in innig contact met elkaar de weefsels op. De methoden van onderzoek, die men tot nu toe meestal volgde, zijn veelal zeer bruikbaar voor de bestudeering der elementen met sterke wandverdikking, maar zij schieten te kort, waar het de teere dunwandige elementen geldt. Daardoor zijn m. i. de eerstgenoemde wel wat eenzijdig het voorwerp der belangstelling geworden. Voor het inzicht in de levensverrichtingen der houtgewassen is echter de kennis van de levende elementen van het grootste gewicht en juist deze hebben als regel weinig verdikte wanden en zij zijn daardoor teer en veelal moeilijker goed waar te nemen: houtparenchym en mergstralen, maar vooral het cambium en de levende elementen van de bast, zeefvaten, begeleidende cellen en phloeoparenchym.

Bij het onderzoek naar de anatomie van verschillende houtgewassen, in verband met de (kunstmatige) vegetatieve vermeerdering, bleek mij, dat voor de vragen, die zich hierbij voordoen in vele gevallen zg. wortelbeginsels of rhizogenen van overwegende beteekenis zijn. Dit zijn meristematische celgroepen, die met het cambium samenhangen en omgeven zijn door harde secundaire weefsels. Aanvankelijk was het er mij in hoofdzaak om te doen ze op te sporen, hun plaatsing in de as na te gaan en quantitative schattingen te maken betreffende hun voorkomen bij verschillende typen van onderstammen. Voor dit doel is het noodig geheele knoopgedeelten, soms zelfs internodiën, in series te snijden en het was daarom noodzakelijk, betrekkelijk dikke coupes

te maken (30 à 40 μ) wilde het werk zich niet in het oneindige rekken. Het ging hier bovendien niet om fijnere details en ik kon dus volstaan met het snijden van het in alcohol en glycerine geplaatste materiaal op een sterk gebouwd sledemicrotoom.

Wanneer het er echter om te doen is zich een nauwkeuriger beeld te vormen van deze wortelbeginsels, van hun bouw en van de anatomie van de as, waarin zij voorkomen, of wel van hun ontwikkeling, dan moet men zich van een fijnere techniek bedienen. De eenige techniek, die ons hier verder kan brengen is m. i. de celloidine-infiltratie. Deze methode, die door DUVAL in 1879 werd gepubliceerd en door EYCLESHEYMER werd verbeterd, werd aanvankelijk alleen op dierlijke weefsels toegepast. Door JEFFREY werd de celloidine-infiltratie bij verhoogde temperatuur en veelal voorafgegaan door behandeling met fluorwaterstofzuur, voor plantaardige objecten uitgewerkt en op het meest weerbarstige materiaal, bv. steenkool, toegepast. Men vindt deze techniek beschreven bij PLOWMAN (1904) en bij JEFFREY (1917). Volgens de daar gegeven voorschriften werkte ik eenigen tijd en ik verkreeg min of meer bevredigende resultaten met zachtere houtsoorten, zooals van *Salix*-species. Bij de hardere, waarmede ik mij daarna in hoofdzaak bezig hield (zooals appel en peer), stuitte ik op moeilijkheden, vooral bij het mijn pogingen goede series te krijgen. Ten deele was dit wel het gevolg hiervan, dat de genoemde beschrijvingen of eenigszins verouderd zijn, zooals die van PLOWMAN, of niet uitvoerig genoeg; ten deele ook wel, doordat het in het algemeen moeilijk is, zulk een min of meer omslachtige techniek alleen uit beschrijvingen te leeren kennen.

In 1927 werd ik door een Fellowship van de INTERNATIONAL EDUCATION BOARD in staat gesteld de methode in Amerika te gaan bestudeeren door eenigen tijd in het botanisch laboratorium van de Cornell University, Ithaca N.Y. te gaan werken onder leiding van prof. A. J. EAMES. Voorts heb ik mij door correspondentie met prof. E. C. JEFFREY en een bezoek aan zijn laboratorium te Cambridge, U.S.A. (Harvard University) zoo goed mogelijk op de hoogte gesteld.

Ik meen, dat het zijn nut kan hebben, de ervaring, die ik betreffende deze techniek heb, op schrift te stellen en zodoende een handleiding te geven, die — naar ik hoop — bruikbaar zal blijken voor hen, die zich met soortgelijke onderzoekingen zullen hebben bezig te houden. Ik heb hierbij, naast de in de literatuurlijst genoemde werken, ook de korte voorschriften, zooals die in het botanisch laboratorium te Ithaca gebruikt worden als leidraad genomen.

Ik doe dit met des te meer vrijmoedigheid, waar prof. EAMES en prof. JEFFREY ¹⁾ zoo welwillend waren mijn manuscript door te lezen en zoo noodig te corrigeeren.

Het is mij een aangename plicht hier deze beide heeren, zoodat de INTERNATIONAL EDUCATION BOARD, mijn warmen dank te betuigen.

Bij de hier volgende beschrijving van de methode zal ik ter vergemakkelijking van het overzicht de opeenvolgende bewerkingen als volgt indeelen:

1. Voorbereiding van het materiaal;
2. Demineralisatie;
3. Infiltratie met celloidine;
4. Snijden;
5. Afwerking der praeparaten, kleuring enz.;
6. Vervaardiging van series.

1. VOORBEREIDING VAN HET MATERIAAL.

Evenals bij de paraffine-infiltratie geldt ook hier, dat de materiaalstukjes slechts betrekkelijk geringe afmetingen mogen hebben, willen de elkaar opvolgende vloeistoffen er snel en volkomen in doordringen. In het algemeen kan men zeggen, dat de stukken hoogstens ongeveer 1 c.M. doorsnee mogen hebben. De afmetingen en de vorm hangen echter ook min of meer af van den aard van het materiaal en de wijze, waarop men dit in het microtoom denkt te bevestigen. Heeft men materiaal onder handen, waarbij de buitenste weefsels het indringen der vloeistoffen belemmeren, dan zal het veelal noodig zijn hierin openingen te prikken of te snijden of wel het orgaan geheel open te snijden.

Ik hield mij hoofdzakelijk bezig met het onderzoek van takken, knopen en internodiën. Voor mijn doel was het veelal gewenscht stukken te gebruiken aanmerkelijk langer dan 1 c.M., omdat ik over een grootere lengte zich uitstrekkende series wilde hebben en het zeer moeilijk is houtige takken zuiver dwars door te snijden, zonder aan weerskanten van de snede nogal wat te verspelen. Het eenige wat men dan doen kan is hier en daar insnijdingen in de schors te maken of kleine stukjes van de kurkhuid te verwijderen. Dit dient echter voorzichtig te gebeuren, want het is,

¹⁾ Professor JEFFREY was zoo vriendelijk mij schriftelijk nog eenige inlichtingen te verstrekken, betreffende het gebruik van alcoholische fluorwaterstofzuuroplossing en over de toepassing van warmte ter versnelling van het weekmakingsproces, en stond mij toe deze nog niet gepubliceerde verbeteringen der techniek in deze handleiding op te nemen.

vooral bij het onderzoek van de op de grens van hout en schors liggende wortelbeginsels, zeer onaangenaam als de schors van het hout loslaat.

Voor het *dooden* en *fixeeren* van het materiaal kan men alleen zoodanige stoffen gebruiken, die den weerstand van de dikke celwanden tegen het snijden niet vergrooten; chroomzuur en picrinezuur moet men daarom liever vermijden.

Voor anatomisch werk is alcohol of formalin-alcohol m. i. het meest aan te bevelen. CHAMBERLAIN geeft aan een mengsel van 6 deelen handelsformaline met 100 alcohol 70 %, of wel 4 à 6 formaline met 100 alcohol 50 %. „For anatomical work this combination is unsurpassed” (CHAMBERLAIN, p. 20). Men kan het materiaal er in laten tot men het verder gaat bewerken. Ook alcohol, zonder eenige andere toevoeging dan water, geeft veelal volkomen bevredigende resultaten, wanneer het niet te doen is om cytologische details, protoplasmastructuren of kerndeelingsfiguren. De concentratie van de alcohol late men afhangen van de geaardheid van het materiaal. Deelen, die veel water bevatten, fixeere men in slappere, hardere en moeilijker doordringbare in sterkere concentraties.

Droog materiaal (bv. herbariummateriaal, droog hout en dg.) dient men vooraf een of meermalen te koken en weer af te koelen. Ten einde de lucht goed te verwijderen dient men hierbij gebruik te maken van een luchtpomp.

2. DEMINERALISATIE.

De hardheid van plantaardige weefsels wordt grootendeels bepaald door de hoeveelheid anorganische stoffen, die in de celwanden is afgezet. Onder deze stoffen neemt het kiezelzuur een belangrijke plaats in. Het ligt dus voor de hand, dat men, als het er om te doen is de snijbaarheid van plantenweefsels te verhoo-gen door onttrekking van de minerale stoffen aan de celwanden, hiervoor fluorwaterstofzuur aanwendt. Het is gebleken voor dit doel zeer bruikbaar te zijn, te meer daar het de middenlamel niet aantast, zoodat de samenhang der deelen behouden blijft. Zachte weefsels en protoplasma worden door het zuur weinig of niet aangefast; het moet echter geen zwavelzuur of salpeterzuur bevatten en het verdient daarom m. i. aanbeveling steeds chemisch zuiver fluorwaterstofzuur te gebruiken. Vooral door deze laatstgenoemde eigenschap is de fluorwaterstofzuurbehandeling van groote waarde bij het onderzoek van meristematische en teere weefsels, die omgeven zijn door harde weefsels, zooals dit bijv. bij het cambium, wortelbeginsels, phloeem en d.g. het geval is.

Volgens JEFFREY is in zulke gevallen nog de voorkeur te geven aan een mengsel van de waterige fluorwaterstofzuuroplossing met gelijke deelen alcohol, waardoor de teere weefsels nog meer volkomen intact blijven.

In het bijzonder is het gebruik van een alcoholische fluorwaterstofzuuroplossing aan te bevelen, als men kan veronderstellen, dat de objecten door een behandeling met water schade zullen onder vinden, zooals bijv. bij slijmachtige veranderingen van den celwand enz. Het verdient dan vaak de voorkeur 70 % of 50 % alcohol te gebruiken als het medium waarin demineralisatie plaats heeft. Daarbij dient men er voor te zorgen, dat men geen sterke hydrofluorwaterstofzuuroplossing gebruikt (ongeveer 10 à 15 %) en dat men deze volkomen mengt met de alcohol bijv. onder omroeren. Anders bestaat er kans op verhitting (of zelfs ontbranding) waardoor het materiaal vernietigd zou kunnen worden.

Apparaat, tijd van inwerking.

Het materiaal moet geruimen tijd aan de inwerking van het fluorwaterstofzuur blootgesteld worden. Men kan hiervoor zeer geschikt kleine wijd-mondsch fleschjes gebruiken („pillenfleschjes" bijv. van 50 c.M³), die van binnen en van buiten voorzien worden met een bedekking van paraffine. Het is noodig ook den rand van den hals hiermee te voorzien; de kurken worden gedrenkt in paraffine. Indien dit alles met zorg gebeurt en de laag niet te dun genomen wordt, voldoen deze geparaffineerde fleschjes zeer goed en behoeft men geen last te hebben van scheuren in de paraffine-bekleding.

Het verdient aanbeveling al het fluorwaterstofzuur-materiaal verwijderd te houden van goede instrumenten, vooral microscopen. Het beste is de voorraadflesschen en de kleine fleschjes met het materiaal in een afzonderlijke goed afgesloten ruimte te bergen, bijv. in een geparaffineerd of gevernisd kistje met goed sluitend deksel.

De concentratie van de fluorwaterstofzuuroplossing en de duur van inwerking hangen af van de geaardheid van het materiaal. In het oude voorschrift van PLOWMAN is nog sprake van 10 % gedurende drie of vier dagen. Intusschen is gebleken, dat dit in zeer vele gevallen onvoldoende is. Voor eenigszins hardere houtsoorten, bv. appel en peer gebruike men een 20 % oplossing (de handelsoplossing verdund met water, 1 : 1) en men late deze ongeveer 1 à 2 weken inwerken. C. F. SWINGLE gebruikte voor appelhout een iets sterkere oplossing (60 % van de handelsoplossing) gedurende 2 à 3 dagen. Bij zeer harde houtsoorten, zooals eikenhout, bij harde sohale en dg. gebruikt men zelfs wel de onver-

dunde 40 % oplossing en men laat deze zoo noodig nog langer, van 3 tot 6 weken, inwerken. De fleschjes, waarin zich het materiaal bevindt, schudde men zoo nu en dan om; bij langdurige inwerking is het gewenscht, vooral als de hoeveelheid vloeistof niet groot is, deze één of meermalen te ververschen. Met een scherp mes kan men de snijbaarheid eenigszins beoordeelen, doch men wassche hiertoe van te voren het materiaal terdege uit in stroomend water.

3. INFILTRATIE MET CELLOIDINE.

Hiervoor moet het materiaal eerst terdege gewasschen worden en vervolgens ontwaterd. Men wascht het op de gewone wijze in stroomend water; kleine stukken bijv. in een cilinderglas bedekt met gaas. Volgens SWINGLE kan men zelfs sporen van fluorwaterstofzuur nog proeven: hij waschte zijn materiaal „until no hydrofluoric acid taste could be detected”.

Het ontwateren dient zorgvuldig te geschieden; het geheele proces neemt 3 à 5 dagen in beslag. Het is noodig absolute alcohol tweemaal aan te wenden. PLOWMAN geeft bijv. aan: 12 uur in 30, 50, 70, 90, 100 en 100 %. Veelal verdient het aanbeveling door middel van een vacuumpomp, lucht te verwijderen, bij voorkeur wanneer het materiaal zich bevindt in de alcoholen van 70 % of 90 %.

Celloidine-oplossingen.

Voor het vervaardigen der celloidine-oplossingen voldoet SCHERING's celloidine zeer goed. De gebruiksaanwijzing, die men bij ieder blik ingesloten vindt, bevat echter eenige onjuistheden, die den beginner veel leed kunnen veroorzaken. Men vindt vermeld: „Jeder Tafel enthält 40 gr. reine trockene Celloidinwolle; den Gewichtsrest bildet Alkohol”. Voor zoover ik heb kunnen nagaan, bedraagt het gewicht van de droge celloidine nooit 40 gr. en haalt veelal zelfs de 35 gram niet. Het is goed dit te weten, wanneer men begrooten moet hoeveel men noodig heeft.

Ergter echter is, dat er behalve alcohol ook steeds een zeker gehalte aan water in de tabletten is. Men dient dus te beginnen met deze fijn te verdeelen en volkomen te drogen. Meestal snijdt men ze; wij geven er hier de voorkeur aan ze over een fijne schaaft te halen (die onderste boven geplaatst wordt), waardoor men in enkele minuten een tablet in een groot aantal dunne linten verdeelt, die zich zeer goed laten drogen. Ik leg ze hiertoe op een glazen schaal en laat ze, bedekt door een stuk papier, eenige dagen staan. Knijpt men ze dan, vóór ze knappend droog zijn, met een sterke schaar in wat kleinere stukken, dan krijgt men

de celloidine tenslotte in een uitstekenden vorm. Indien men geen goed droog vertrek heeft, kan het noodig zijn ze nog eenigen tijd wat sterker te drogen, bijv. door ze op een radiator te plaatsen.

Men doet het beste niet méér te snijden en te drogen dan men direct noodig heeft voor het maken der oplossingen. Heeft men een deel van een tablet over, dan snijdt men dit in stukken en bewaart het in luchtdicht gesloten cylinderglazen; aan de lucht verdrogen zij snel en zijn dan niet meer te snijden. Gedroogde snippers en resten kan men het best onder water bewaren. Celloidine is nitrocellulose en ofschoon het gevaar voor explosie van de gedroogde celloidine naar het mij voorkomt zeer gering is, doet men toch beter voor alle zekerheid, ook met het oog op mogelijke chemische veranderingen, de stof onder water te bewaren.

Men lost nu de volkomen gedroogde celloidine op in gelijke deelen alcohol en ether. Beide moeten zuiver zijn en volkomen watervrij. Men dient de volgende oplossingen gereed te maken: 2, 4, 6, enz. tot 12 of 14 %.¹⁾ Men gebruikt hiervoor wijdmondsstopflesschen, die met kurken (van prima qualiteit) gesloten worden. Indien — wat vooral ook bij de hoogere concentraties wel het geval wil zijn — de celloidine niet goed oplost, kan men dit bespoedigen door de flesch in een klem te zetten en vervolgens eenigen tijd in een thermostaat te plaatsen bij 40 à 50° C. Ik gebruik voor deze voorraadflesschen stopflesschen van 200 à 300 c.M³. inhoud.

Men brengt nu het materiaal achtereenvolgens in deze oplossingen. Als regel doet men goed het gedurende 24 uur in de 2 % oplossing te laten (waarin men het snel vanuit de absolute alcohol overbrengt) en gedurende 12 uur in de volgende concentraties. De infiltratie moet onder verhooging van temperatuur geschieden en men plaatst daartoe het fleschje in een thermostaat. JEFFREY bindt hiertoe de kurk met koperdraad vast. Ik geef de voorkeur aan een eenvoudigen klem van plaatijzer (bijv. ter dikte van 0.7 à 0.8 m.M.), waar men het fleschje onmiddellijk kan inplaatsen en uitnemen. Is de klem iets te ruim, dan kan men door middel van 1 of 2 houten wigjes de kurk vast in den hals drukken. Zulke klemmen nemen slechts zeer weinig ruimte in de thermostaat in beslag.

Over de temperatuur, waarbij de infiltratie het best plaatsgrijpt, bestaat verschil van meening. Terwijl EAMES de temperatuur opvoert tot 55° à 60°, zelfs wel hooger, gaat JEFFREY niet hooger dan 45° en is van meening, dat hoogere temperaturen een

1) Kortheidshalve voor: 2 gr., 4 gr. enz. opgelost in 50 cM³. alcohol + 50 cM³. ether.

goede infiltratie veeleer belemmeren. Mijn eigen ervaring is nog niet groot genoeg om hierin te kunnen beslissen.

Het is noodig voor de fleschjes, waarin men het materiaal doortrekt met de celloidine, eerste qualiteit kurken te gebruiken, die goed afsluiten en niet licht breken. Heeft men goed sluitende kurken, dan kan men het fleschje, in de klem, onderste boven in de thermostaat zetten en zoodoende verdamping van ether voorkomen. Bij het opvoeren in hoogere concentratie koelt men het fleschje, waarin zich het materiaal bevindt, af (bijv. door het even buiten te plaatsen), giet de celloidine weder in de voorraad-flesch en schenkt de sterker geconcentreerde oplossing in het fleschje. Het verdient geen aanbeveling hierbij hooger dan 14 % te gaan, want de hoogere concentraties worden zeer onhandelbaar. Men voert deze nu verder op door eenige malen snippers droge celloidine er aan toe te voegen, waarbij men er voor moet zorgen, dat deze niet in directe aanraking zijn met het materiaal en telkens plaatst men het fleschje weder gedurende 12 uur in de thermostaat. Op deze wijze gaat men voort, totdat de vloeistof zeer dik wordt, zóó dat ze bij kamertemperatuur weinig of niet vloeibaar is.

Desgewenscht kan men het infiltratieproces in iedere phase eenigen tijd onderbreken. Men late het materiaal dan echter niet in de thermostaat staan, doch plaatse het bij kamertemperatuur, totdat men het proces weder kan vervolgen. Langdurig voortgezette verwarming maakt de celloidine moeilijker oplosbaar.

Tenslotte neemt men met een pincet het materiaal uit de taaië massa, waarbij men het zooveel mogelijk rondom voorziet met een dikke celloidine-bekleding en brengt het in chloroform. Men doopt het gedurende eenige seconden daarin, maakt het los van het pincet en laat het daarna gedurende 6 à 12 uur in de chloroform staan. Men bewaart het aldus toebereide materiaal in een mengsel van gelijke deelen glycerine en alcohol 50 %. Hierin kan men het onbepaald lang bewaren, tot men het wenscht te snijden. JEFFREY heeft na 20 jaren zulk materiaal nog in uitstekenden toestand gevonden.

Bij het snijden van het materiaal kan men met de loupe min of meer beoordeelen of de infiltratie goed geslaagd is: het vertoont dan op de doorsnede een eigenaardige donkere tint, die er op wijst, dat het geheel doortrokken is met celloidine.

4. SNIJDEN.

Voor het snijden van het hier bedoelde materiaal is alleen een sterk gebouwd slede-microtoom te gebruiken; ook de messen

moeten zwaar en van prima kwaliteit zijn. Ik heb alleen onder-
vinding van het door de firma R. JUNG te Heidelberg voor dit
doel gebouwde apparaat en van een Amerikaansch microtoom
(het THOMSON—JEFFREY microtoom, geleverd door BAUSCH and
LOMB, Optical Company, Rochester, N.Y.), dat hier echter, alleen
reeds om de voor Europa zeer hooge aanschaffingskosten, buiten
beschouwing kan blijven.

Het door mij tot nu toe gebruikte microtoom F5 (van R. JUNG)
— dat mij, behoudens eenige ondergeschikte dingen, zeer goed
voldeed — wordt thans door deze firma niet meer geleverd en is
vervangen door het nog aanmerkelijk verbeterde model H. De
belangrijkste wijzigingen zijn:

1. De objecthouder rust in een halfkogelvormige kom en wordt
daarin door twee schroeven zeer gemakkelijk georiënteerd en ver-
volgens door een excentriek-inrichting volkomen vastgezet.

2. De objecthouder bevindt zich op een zwaren cylinder, die
in een eveneens dikken metalen mantel op en neer bewogen kan
worden. Deze deelen zijn uiterst solide gebouwd, waardoor de
objecthouder hoogst stabiel is.

3. De grovere instelling geschiedt hier door een kruk; (bij F5
geschiedde dit door een hefboom).

4. De bewegelijke deelen van den objectdrager zijn door een
metalen schaalte met afvoerbuis bedekt, wat vooral zeer nuttig
is wanneer men zich van een druppelinrichting bedient.

Voor messenhouders zijn in het bijzonder, die onder n°. 206 of
207 beschreven, aan te bevelen, waarbij het mes t. o. van het
horizontale vlak gedraaid kan worden.

Bevestigen van het object in het microtoom.

De objectdrager van het hier gebruikte microtoom bestaat uit
een klem-inrichting, waarbij een blokje door middel van een
schroef tusschen twee metalen platen wordt vastgeklemd. Het
bevestigen van het object kan hier op twee wijzen geschieden:

a. Men kan het vastmaken op een blokje hout en dit vervol-
gens vastklemmen, of wel

b. men kan het object zelf vastklemmen.

a. In het algemeen zal men kleinere voorwerpen (waar het
grondvlak betrekkelijk groot is t. o. van de lengte, hoogte) kun-
nen vastmaken op een blokje hout. Men kiest hiervoor dicoty-
ledone hout, liefst wat grof van vezel. Het naar boven te richten
oppervlak hiervan, moet glad gemaakt worden en vervolgens met
celloidine bedekt. Men doet dit door het in 4 % celloidine te doo-
pen en vervolgens te laten drogen. Bij nieuwe blokjes dient men
dit nog eens te herhalen.

Vervolgens wordt het materiaal-blokje uit de glycerine-alcohol genomen, afgeveegd en zóó afgesneden, dat het in de gewenschte positie op het blokje geplaatst kan worden. Vooral de onderzijde moet goed gereinigd worden, daarna in 4 % of 6 % celloidine worden gedoopt en vervolgens eenige oogenblikken op het blokje gedrukt. Vervolgens legt men het ongeveer een kwartier weg (kamer temp.), waarna het stevig bevestigd is.

b. Heeft men grootere, in het bijzonder langere, objecten, bijv. langere deelen van takken, dan moet men deze, met hun celloidinmantel, direct vastklemmen. Ik gebruik hiervoor houten blokjes, waarin een cilindervormige opening geboord is en die vervolgens gehalveerd zijn. Men kan zich een serie van zulke gehalveerde blokjes maken met verschillende openingwijdte, zoodat men een passende kan uitkiezen. Veelal zal het aanbeveling verdienen de opening wat te wijd te kiezen en deze nog met een paar kurkstrookjes te bekleden. Hierin kan het object dan zonder beschadiging goed vastgeklemd worden. Het spreekt vanzelf, dat in dit geval alleen het boven de blokjes uitstekende deel gesneden kan worden.

Wat nu het eigenlijke snijden betreft, het is moeilijk hieromtrent voorschriften te geven, daar dit wel in hoofdzaak een quaestie van routine is. De volgende aanwijzingen kunnen misschien van nut zijn:

Bij het snijden worden het mes en het celloidine-blokje steeds vochtig gehouden, met 90 % of 95 % alcohol. Men kan dit doen door middel van het penseel waarmede de coupes van het mes genomen worden of wel met een druppelinrichting. Mij persoonlijk bevalt het laatste het beste, o. a. omdat men hierbij de hoeveelheid vocht op het mes beter regelen kan. Druppelapparaten, die geregeld kunnen worden door luchtdruk, worden eveneens door JUNG geleverd. Men kan echter zeer gemakkelijk er zelf een samenstellen van een glazen reservoir aan een statief en een gummislangetje met klemkraan. Vooral ook als het er om te doen is series te maken, lijkt mij het werken met een druppel-inrichting te verkiezen. Bovendien heeft dit het voordeel, dat men het object in het microtoom zoo noodig eenigen tijd aan zich zelf kan overlaten zonder gevaar van uitdrogen.

De beste stand van het mes leert men door ondervinding wel kennen. In het algemeen is het gewenscht het mes een scherp hoek met de bewegingsrichting te laten maken, zoodat het met lange sneden door het object heen snijdt. In de messenhouders (n^o. 206 en 207 van JUNG) is den stand van het mes t. o. van het horizontale vlak gemakkelijk te regelen. Het mes dient een eenigszins schuinen stand te hebben, in het algemeen echter moet de

hellingshoek vrij scherp zijn. JEFFREY geeft aan, dat bij groote objecten of zulke, die neiging hebben te krullen een schuinere stand van het mes soms voordeelig is.

Men drukt het vochtige penseel zachtjes boven op het object, geeft het mes een niet te snelle regelmatige beweging en laat de coupe op het mes overglijden. Daarna brengt men het door middel van het penseel of penseel en spatel over in een horlogeglas met 95 % alcohol. Wanneer de coupes krullen, na in alcohol geplaatst te zijn, kan men dit volgens JEFFREY ten deele voorkomen door ze bijna droog te laten worden op het oppervlak van het mes, op eenigen afstand van dat deel, dat voor het snijden gebruikt wordt. Ik heb dit een enkele maal beproefd, zonder er veel baat bij te vinden; wellicht echter heeft men er somtijds succes mede.

In sommige gevallen, in het bijzonder wanneer men de coupes in serie aan een voorloopig onderzoek wil onderwerpen, doet men beter te druppelen met een mengsel van glycerine en alcohol en ze aanstonds in volgorde op groote objectglazen over te brengen.

De dikte der doorsneden dient men te laten afhangen van het doel, dat men er mee beoogt. Voor anatomisch werk is 10 μ gewoonlijk dun genoeg en zelfs voor microphotographie kunnen zulke coupes vaak zeer goed dienen.

5. VERVAARDIGING VAN PREPARATEN, KLEURING, ENZ.

De verdere behandeling der coupes hangt geheel af van het doel, dat men zich gesteld heeft. Is het slechts om bepaalde, afzonderlijke doorsneden te doen, dan kan men zijn coupes in een horlogeglas brengen en met een loupe nazien ten einde de gewenschte er uit te zoeken; of wel, indien dit niet nauwkeurig genoeg is, men maakt op de reeds vermelde wijze een serie in glycerine en zoekt onder het microscoop uit, welke men verder wil afwerken. In sommige gevallen leenen zich reeds de ongekleurde coupes zeer goed voor de bestudeering, soms zelfs verdienen zij de voorkeur boven gekleurde. Wil men de series langeren tijd in glycerine bewaren, dan doet men beter er een dekglas op te plaatsen. Zulke glycerineseries maak ik bij voorkeur op groote voorwerpglazen (bijv. 87 \times 37 m.M.) met groote dekglazen (45 \times 36 m.M.). Men kan deze series, als men aan de glycerine een weinig carbolzuur toevoegt, langen tijd goed houden. Wij bewaren ze in houten mappen, vervaardigd van triplex en een raampje van dunne latjes. Ook in het midden bevindt zich zulk een latje, zoodat er twee rijen van 10 preparaten van het genoemde formaat in geplaatst kunnen worden. De latjes worden zóó dik genomen (4 à 5 m.M.), dat men de mappen opeengestapeld kan opbergen.

Voor de kleuring en insluiting van afzonderlijke coupes kunnen de gebruikelijke methoden gevolgd worden. De celloidine kan hierbij permanent in de doorsneden blijven, zelfs als men microphoto's wenscht te maken. Dit is een groot voordeel in die gevallen, waarbij de coupes bij verwijdering der celloidine uiteen zouden vallen. Men dient er dan echter voor te zorgen, dat ze zoo weinig mogelijk gekleurd wordt. Ook is het noodig een weinig chloroform aan de absolute alcohol toe te voegen bij het dehydreren. Maar in den regel verdient het de voorkeur de celloidine te verwijderen door middel van ether; men kan dit dan het best doen na de kleuringen, hetzij vóór de behandeling met absolute alcohol of onmiddellijk daarna.

Voor anatomisch werk geeft een dubbel-kleuring met haematoxyline en saffranine in den regel goede resultaten (CHAMBERLAIN, p. 124). Men kan hierbij HEIDENHAIN's methode volgen, waarbij het beitsen met ijzeraluin aan de kleuring voorafgaat of wel DELAFIELD's haematoxyline gebruiken. Het eerste is vooral aan te bevelen voor microphotographische doeleinden. DELAFIELD's haematoxyline heeft echter ook zijn voordeelen. CHAMBERLAIN beveelt het sterk aan: „When ever you are in doubt as to the selection of a stain for general purposes, we should advise the use of DELAFIELDS' haematoxyline.” Men dient echter goed uitgerijpte haematoxyline te gebruiken. Deze heeft echter ook het voordeel gedurende onbepaalden tijd goed te blijven. Ik heb er, ook voor microphotographie, zeer goede resultaten mede verkregen. Volgens CHAMBERLAIN kleurt het cellulosewanden zelfs beter dan HEIDENHAIN. Saffranine kleurt verhoutte en verkurkte wanden helder rood en geeft daardoor een goede tegenkleuring voor anatomisch werk.

De kleuring van afzonderlijke coupes met HEIDENHAIN's haematoxyline, laat zich goed uitvoeren volgens het volgende schema (EAMES):

1. Beitsen in 3 % oplossing van ijzeraluin (ferri-ammoniumsulfaat), gedurende eenige minuten (10 à 15 volgens JEFFREY).
2. Goed uitwasschen, driemaal achtereenvolgens in zuiver water. („Indien het materiaal veel tannine bevat, dient men er in het bijzonder voor te zorgen, dat de coupe zeer goed wordt uitgewasschen, herhaalde malen in gedestilleerd water”; JEFFREY).
3. Kleuren in haematoxyline. Men maakt een voorraadoplossing van 1 % in absolute alcohol of van $\frac{1}{4}$ % in water. Hiervan voegt men een weinig toe aan een horlogeglas met water; men laat de coupe hierin, totdat zij voldoende blauw gekleurd is.

Men kan dit met de loupe of onder het microscoop controleren.

4. Even uitwasschen in water, daarna kleuren in saffranine. Hier van maakt men eveneens een voorraadoplossing, bijv. een verzadigde oplossing van de in alcohol oplosbare saffranine in 95 % alcohol. Men voegt eenige druppels hiervan toe aan een horlogeglas met water en brengt de coupe hierin; 2 à 5 minuten zijn in den regel voldoende.
5. Ontwateren. De coupe wordt even gespoeld in water en vervolgens snel door de alcoholen opgevoerd, bijv. 50, 70, 95 en 100 %. Veelal kan men zonder bezwaar de beide eerste overslaan. Vooral de saffranine wordt in de 70 % en 95 % alcohol sterk uitgetrokken, iets waarvan men zoo noodig gebruik kan maken om de roode tegenkleuring te verzwakken. In de absolute (ethyl-)alcohol vindt slechts zeer weinig ontkleuring plaats; hierin moet de coupe volkomen ontwaterd worden.
6. Verwijdering van de celloidine; hiertoe plaatst men de coupe eenige minuten in ether (eveneens watervrij).
7. Benzol (of xylol).
8. Canada balsem in benzol (of xylol). Volgens EAMES dient men aan benzol en in benzol opgeloste balsem de voorkeur te geven. M. i. is echter xylol ook zeer goed te gebruiken.

Deze betrekkelijk eenvoudige methode geeft voor afzonderlijke coupes zeer goede resultaten.

6. VERVAARDIGING VAN SERIES.

De celloidine-techniek is vrij omslachtig en bewerkelijk, maar men kan er veelal zeer goede resultaten mee bereiken. De grootste moeilijkheden doen zich naar mijn ervaring voor, wanneer men haar tracht toe te passen op serie-werk. Nu zijn echter volledige series juist ook voor anatomisch onderzoek veelal van groot belang.

Op verschillende wijzen heeft men getracht de celloidine-techniek op serie-werk toe te passen. In de eerste plaats kan men, zooals op bldz. 12 beschreven is, series in glycerine maken en hieruit afzonderlijke coupes uitkiezen voor kleuring en afwerking.

Het vervaardigen van duurzame series van gekleurde preparaten werd beproefd door:

1. A. B. PLOWMAN, in het laboratorium van JEFFREY (1904).
2. A. S. FOSTER (1926).
3. C. F. SWINGLE (1927).

SWINGLE werkte volgens de „double embedded method”. Hij plaatste zijn celloidinemateriaal, nadat het gehard was in chloroform, in xylol (die herhaaldelijk ververscht werd) en sloot het vervolgens in, in paraffine. „Dit maakte het mogelijk coupes-series te snijden op een Minot-microtoom (rotary microtome) en doorsneden te krijgen, 8 à 10 μ , van appeltakken van 10 jaar oud. Door de linten van coupes op voorwerpglazen te plaatsen en ze door middel van fijn muskietengaas, dat er met draad om heen gebonden werd, op hun plaats te houden, was het mogelijk de series op het voorwerpglas te kleuren.” Ik heb deze dubbele inbedding nog niet beproefd. Wellicht is de methode bruikbaar voor algemeen topographisch werk, maar ik twijfel er sterk aan of ze bruikbaar is voor een nauwkeurig onderzoek van plantenweefsels en organen. Wat ik gezien heb van de resultaten van SWINGLE, vond ik in dit opzicht niet overtuigend.

A. S. FOSTER (1926) heeft in de laatste jaren een andere methode uitgewerkt, waarbij tot kleine linten vereenigde doorsneden gekleurd worden zonder voorafgaande bevestiging op het voorwerpglas. Hierbij worden de doorsneden door middel van een celloidine-oplossing aan elkaar bevestigd en vervolgens kleine linten, uit één of meer rijen van coupes bestaande verder afgewerkt, gekleurd, enz.

Dr. FOSTER heeft, zooals mij uit zijn preparaten gebleken is, met deze methode goede resultaten bereikt; evenzoo ook andere onderzoekers aan het Bussey Institution. Aangezien zij kortgeleden gepubliceerd is, is het overbodig de methode hier uitvoerig te beschrijven. Ik wil hier volstaan met eenige aanvullingen, die Dr. FOSTER zoo vriendelijk was mij te doen toekomen:

1. De celloidinebal moet zoo zuiver mogelijk vierkant afgesneden worden, aangezien de doorsneden rechthoekig van vorm moeten zijn om ze tot linten te kunnen vereenigen.
2. Ieder spoor alcohol dient verwijderd te worden van de coupes op het voorwerpglas, door er voorzichtig een stuk filtreerpapier op te drukken. Met eenige oefening kan men dit doen, zonder doorsneden met het filtreerpapier van het objectglas te lichten. Indien dit gebeurt, plaatst men ze weder op het voorwerpglas, brengt er 70 % alcohol op en rangschikt de coupes opnieuw.
3. Voor het aan elkaar bevestigen van de coupes gebruikte men een zeer verdunde celloidine-oplossing (2 %). Men moet trachten gelijke, zekere streken te maken tusschen de doorsneden en vermijden het object zelf (de eigenlijke doorsneden) te bestrijken.

4. Goed gemaakte linten kunnen zonder bezwaar gehanteerd worden (bijv. uit de kleurbaden of de alcoholen genomen) en op een voorwerpglas onder het microscoop gelegd worden. Indien de linten neiging hebben te breken, dient men het bestrijken zorgvuldiger te herhalen en in sommige gevallen is het wenschelijk ze gedurende eenige dagen in 70 % alcohol te laten alvorens ze te kleuren.
5. Kruidnagelolie ter opheldering kan men bij deze methode niet gebruiken, want dit lost de celloidine op; wel xylol.
6. Een van de voordeelen van de methode is, dat men ook betrekkelijk dikke doorsneden in series kan kleuren zonder voorafgaande bevestiging op het objectglas.

Mijn eigen ervaring beperkt zich tot de methode, die door PLOWMAN (1904) als volgt werd beschreven: „De coupes worden gesneden in een mengsel van 90 % alcohol, 85 deelen en glycerine, 15 deelen. Zij worden in volgorde gelegd op zacht, dun papier. Wanneer de alcohol verdampt is, legt men dit papier onderste boven op een voorwerpglas, dat met eiwitglycerine is besmeerd, legt er nog eenige laagjes papier overheen en drukt alles goed aan, bijv. door middel van een caoutchouc photographieroller. Vervolgens legt men een tweede voorwerpglas boven op de papierlaagjes, zet het geheel tusschen een paar klemmetjes en plaatst het in de stoof teneinde gedurende ongeveer twaalf uur te drogen. Te lang mag men dit niet voortzetten, daar dit de celloidine min of meer onoplosbaar maakt. Het papier kan er dan afgenomen worden, waarbij de coupes aan het voorwerpglas bevestigd blijven. Vervolgens laat men op de gewone wijze het voorwerpglas met de coupes de alcohol, ether, kleurbladen enz. passeeren.”

Ik paste deze methode eenigen tijd toe en het bléek mij, dat er in vele gevallen goede resultaten mee te bereiken zijn. Zij is ongetwijfeld minder bewerkelijk dan de door FOSTER uitgewerkte methode. Ik verkreeg op deze wijze series van zachte houtsoorten (*Salix*); de coupes zijn 10 μ dik en zij werden op het objectglas gekleurd volgens een schema van CHAMBERLAIN (p. 100). Ik had hierbij geen last van het loslaten der doorsneden gedurende het kleurings- en ontwateringsproces. Dit is evenwel de grootste moeilijkheid bij deze methode, vooral wanneer men met hardere houtsoorten te doen heeft. Wanneer de coupes neiging hebben te krullen bij het snijden, bestaat er alle kans, dat het merendeel loslaat bij de verdere bewerkingen. Het eenige wat men kan doen om het te voorkomen is het demineralisatieproces langer voort te zetten, teneinde het materiaal weeker te maken en meer eiwit-

glycerine aan te wenden dan men bij paraffinewerk gebruikt. Men kan ook trachten het euvel te ondervangen, door de coupes zoo dun mogelijk te maken. Daar echter voor anatomisch onderzoek de doorsneden in de meeste gevallen niet dunner behoeven te zijn dan 10μ , wordt hierdoor het werk onnoodig vermeerderd. In den regel is het zeer moeilijk de coupes dunner te maken dan 5μ . Ook voor fotografische doeleinden zijn doorsneden van 10μ veelal zeer goed bruikbaar.

LITERATUUR.

- CHAMBERLAIN, C. J., *Methods in plant histology*; 4th. ed. 1924.
- FOSTER, A. S., The strip method for serial celloidin sections; *Bot. Gaz.* 81 : 339—341; 1926.
- JEFFREY, E. C., The anatomy of woody plants; Chapter XXXII: *Anatomical Technique*; 1917.
- PLOWMAN, A. B., The celloidin method with hard tissues; *Bot. Gaz.* 37 : 456—461; 1904.
- SWINGLE, C. F., Burrknot formations in relation to the vascular system of the apple stem. *Journal of Agr. Res.* 34 : 533—544; 1926.

Even voor het ter perse gaan van dit artikel vind ik in het April nummer „*Science*” (Vol. LXVII, p. 400—401) in „The collodion method and serial sections” door E. ELEANOR CAROTHERS, nog een andere methode voor de vervaardiging van series beschreven.

THE APPLICATION OF THE CELLOIDIN METHOD TO THE ANATOMY OF WOODY PLANTS.

A thorough knowledge of the structure of the organs of plants is of the greatest importance for our insight into their functions. This is a very simple truth; it stands to reason that if we wish to understand how a certain machine works, we should first acquaint ourselves with its construction as fully as possible. Yet this is a truth which is not always kept in mind. It is a strange fact indeed that even prominent scientists can work with a certain object for years without exerting themselves to get as thorough a knowledge of its structure as the means at hand permit. For instance VOECHTING — though he worked with *Salix* cuttings during a large part of his life — never showed much interest in the inner structure of these objects.

Perhaps the idea—more or less conscious—that the anatomical structure of plants is about worked out, may be the cause of this fact; or it may be partly due to a certain aversion to work which requires so much time and patience. But sometimes one cannot escape the impression that anatomical work is considered somewhat inferior and that biology as a science really begins only where physics and chemistry (and mathematics!) play important rôles.

P. W. ZIMMERMAN e. g. (Vegetative propagation with special reference to cuttings, Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 1925) after having mentioned some cases where adventitious roots appear with great regularity about certain regions on the stem, says: „Microchemistry should prove valuable when response is localized“. In my opinion micro-scopy should precede micro-chemistry in such cases.

It is mainly due to a highly developed microtome technique that cytology has become an important science of its own and of great importance for genetics. Since MALPIGHI and GREW laid the foundations of plant anatomy, this subject has developed gradually into an extensive and impressive science. Nevertheless, much work is still to be done in this field. If we cultivate it in the hope of getting a better insight into the functions of the organs, even the most minute details can be of great importance and we should not rest until all resources of technique are exhausted.

Due to changes in chemical composition, impregnation etc. the cell walls, especially thick cellulose walls constitute the greatest obstacle to minute histological research in plant anatomy. Woody plants are built up of soft thin-walled elements along with others with thick walls (often lignified, suberized, etc.) and in many regions both elements are in close contact with each other. The methods of research thus far applied, are often very useful for the thick-walled elements, but for an exact study of the soft and thin-walled elements such methods fall short; consequently the interest of anatomists has been concentrated on the former. Yet for the understanding of the functions of tissues and organs in woody plants, a thorough knowledge of the living elements is indispensable and these as a rule are soft and thin-walled, making them in consequence more difficult to observe in all detail. Wood parenchyma, rays, and more especially the cambium and the living elements of the

phloem — the sieve tubes and their companion cells and the phloem parenchyma — are some of the types of thin-walled cells we have to deal with in woody plants.

In my work on the relation between the anatomical structure of woody plants and their fitness for vegetative propagation, I found that in many cases stem-borne root-germs or rhizogenes play an important rôle. These root initials occur as groups of small, meristematic cells; they are connected with the cambium and are generally surrounded by hard, secondary tissues. At first, I wanted to find them, to determine their location in the stem, and to make quantitative estimates of their presence in different types of fruit stocks. For this purpose it was necessary to section entire nodes, sometimes even entire internodes; as a consequence I was compelled to make the sections rather thick (30 to 40 μ) in order to avoid endless work. Moreover, as I was not concerned with minute details, I could use material that had been preserved in alcohol and placed for some days in a mixture of alcohol and glycerine, sectioning without further preparation, on a heavy sliding microtome. But to get an exact idea of these root-germs, of their structure and of the general anatomy of the stem in which they are found, we must resort to a more refined technique. The only method that in my opinion is really useful in such cases, is the celloidin infiltration. This method was published by DUVAL in 1879 and was improved by EYLESHEIMER. Originally it was used only in animal histology. JEFFREY applied it to botanical anatomy and combining it with hydrofluoric acid treatment and infiltration at higher temperatures, he improved the celloidin method to such an extent that he was able to section material as refractory as coal. In the literature we find some papers on this method, for example that by PLOWMAN (1904) and that by JEFFREY (1917). I worked for some time following these directions, sometimes obtaining rather satisfactory results, especially with soft woods such as *Salix*. Working with harder woods (for instance apple and pear), I met with difficulties, especially in my efforts to get good series of such material. This may be due partly to the fact that these papers are more or less out of date, or not detailed enough, partly to the fact that in general it is difficult to learn a rather cumbersome technique such as a celloidin method from only written directions.

Through a Fellowship granted by the INTERNATIONAL EDUCATION BOARD I was enabled to visit the United States in 1927 in order to study this method under the guidance of Prof. A. J. EAMES, in the Botanical Laboratory of Cornell University, Ithaca, N.Y.

I have also acquainted myself with it as much as possible through correspondence with Prof. E. C. JEFFREY and by a visit to his laboratory at Harvard University. It may be of use to draw up in writing my experience with this technique, giving in this way some instructions for those who may carry out similar studies with woody plants. In addition to the papers mentioned in the literature list, I used as a guide the short directions used in the Botanical Laboratory at Ithaca.

Both Prof. EAMES and Prof. JEFFREY¹⁾ were kind enough to read this paper before publication, correcting where necessary. The writer desires to express here his appreciation to them for their kind assistance; his sincere thanks are also due the INTERNATIONAL EDUCATION BOARD for the opportunity given him.

¹⁾ Prof. JEFFREY had the kindness to furnish me with some additional suggestions regarding the use of alcoholic hydrofluoric acid and of the application of heat for a rapid softening of very hard material.

In my description of this method of celloidin embedding, I shall divide the whole process into the following steps:

1. Preparation of material.
2. Demineralization.
3. Infiltration with celloidin.
4. Sectioning.
5. Mounting, staining etc.
6. Serial work.

1. PREPARATION OF MATERIAL.

To insure a rapid and thorough infiltration of the successive fluids, the material should, as in the paraffin method, be in relatively small pieces. For anatomical work this often is a great inconvenience. In general we may say that the pieces should not be more than one centimeter in length; the dimensions and form depend more or less upon the nature of the material and the way in which it is to be held in the microtome. If the outer tissues are apt to prevent the penetration of the fluid, it often may be necessary to prick or cut holes in them and where possible, it may be desirable to cut open the whole organ.

I have been working mainly with nodes and internodes of woody branches. For my purpose I often had to use much longer pieces, as I had to have complete series from greater lengths of stem than 1 cM., it being rather difficult to divide woody stems into smaller pieces without losing much on both sides of the cut. In such cases, I either made incisions here and there in the bark or abraded the cork. However this must be done carefully for it is very troublesome when the bark separates from the wood, especially in studying the root-germs which are situated just between these tissues.

For killing and fixing, any reagents may be used that do not increase the resistance of the thick walls to sectioning; chromic acid and picric acid should be avoided for this reason. In my opinion alcohol, or a mixture of formalin and alcohol, is highly recommendable for anatomical work. CHAMBERLAIN recommends a mixture of 6 c. c. commercial formalin and 100 c. c. of 70 per cent alcohol, or 4—6 c. c. of formalin with 100 c. c. of 50 per cent alcohol: „For anatomical work this combination is unsurpassed”. The material can be kept in this fluid until wanted for use.

Alcohol without formalin may also give satisfactory results if cytological details such as mitotic figures are not required. The concentration of the alcohol should depend upon the nature of the material. Material which, due to its high water content, is subject to shrinkage, should be fixed in alcohol of a lower percentage than should hard and less penetrable tissues. Dry material, such as herbarium specimens, dry and dead wood etc., should be boiled previously one or more times, and the air should be removed by means of a vacuum pump.

2. DEMINERALIZATION.

The hardness of plant tissues is chiefly determined by the amount of inorganic substances deposited in the cell walls. Among these substances, silica is of primary importance, hence it is apparent that if we wish to soften the material by removing these deposits, we should use hydrofluoric acid. This acid appears to be extremely useful for this purpose, especially since it does not dissolve the middle lamella. Soft tissues and protoplasm are not attacked by it unless it is impure (hydrofluoric acid containing sulfuric or nitric acid should be avoided; for this reason chemically pure hydrofluoric acid is recommended); hence treatment with hydrofluoric acid is very useful

for the study of meristematic and other soft tissues surrounded by hard ones, such as cambium, rootgerms, phloem etc. For such tissues, JEFFREY recommends the use of alcoholic hydrofluoric acid; according to his observations, the soft tissues are even less injured than with aqueous hydrofluoric acid.

The use of alcoholic hydrofluoric acid in the case of delicate objects is as follows. If the objects are likely to suffer in water as, for example, is the case with crystals of calcium oxalate or mucilaginous modifications of the cell wall, etc., etc., it is often advantageous to use seventy or fifty per cent alcohol as a medium in which to remove mineral substances. Care should be taken in adding the hydrofluoric acid not to use it of too great strength (from ten to fifteen percent) and it should be thoroughly mixed with the alcohol by stirring or agitation. Otherwise heating or even fire may result and in either case the material is destroyed.

Apparatus.

Small bottles of 50 c.c. capacity, coated internally and externally with paraffin or wax are well suited to this purpose. The neck also should be coated and the corks drenched with paraffin. If this is done carefully and the layer of paraffin is not too thin, such bottles are very satisfactory and will not show cracks in the paraffin coat.

Hydrofluoric acid should be handled with care and, as the vapour is harmful to instruments (microscopes etc.), it is recommended that it be kept apart from these. I put all hydrofluoric acid material in a tight, varnished, wooden box.

Concentration and duration of treatment.

Both of these factors depend upon the nature of the material. In the old directions given by PLOWMAN (1904), this author mentions a solution of 10 per cent acting during 3 or 4 days; it has been found that in most cases this is quite insufficient. For somewhat harder woods, such as those of the apple and the pear, from one to two weeks in a 20 % solution may be required.

C. F. SWINGLE used for apple wood a stronger solution — full - strength commercial fluid (60 %) — during two or three days. If the material is very hard, for example oak wood or hard shells, acid of full strength should be used, for a period of three to six weeks or sometimes still longer.

The bottles containing the material should be shaken now and then and with prolonged treatment it may be desirable to renew it, especially when but small quantities of the liquid are used. By means of a sharp knife it is possible to judge fairly well whether or not the material is soft enough to be sectioned, but first the acid should be washed out.

Application of heat.

Prof. JEFFREY has found recently that heating in an autoclave is a great advantage in the case of very resistant tissues or substances such, for example, as ebony, pock-wood (*Lignum vitae*), cocoanut shells, peach stones, date stones etc. For this purpose he found very convenient a small dental autoclave which heats up to the vulcanizing point of rubber (160° C.). Oak wood even when quite hard when heated in an autoclave for half an hour or a little longer needs only very short treatment with hydrofluoric acid, a day or two at most. He has found this method also quite useful in the case of corky tissues which are extremely hard to infiltrate. Common bottle cork will become wet after an exposure of an hour or more in the autoclave and can then be readily infiltrated with alcohol under the air pump. This method is a very great saver of time but naturally is only applicable to homogeneous, hard, or resistant tissues.

3. INFILTRATION WITH CELLOIDIN.

After demineralization the material is washed thoroughly; this can be done in the usual way, i. e. in running water, the small pieces being placed in a gauze-covered vessel. According to SWINGLE, even slight traces of hydrofluoric acid can be discovered by taste; he washed his material „until no hydrofluoric acid taste could be detected“.

Then the material must be completely dehydrated. For anatomical work a more rapid transition can be used than is necessary for cytological work. The whole process takes from three to five days. Two treatments with absolute alcohol are necessary. PLOWMAN gives: 12 hours each in 30, 50, 70, 90, 100 and 100 % alcohol respectively. Removal of the air and the gases resulting from the treatment with hydrofluoric acid, by means of a vacuum pump, is often desirable, especially in the high alcohols.

Apparatus; celloidin solutions.

For preparing the celloidin solutions SCHERING's celloidin should be used. This can be obtained from E. SCHERING Berlin N. 39 (In U.S.A. DU PONT's Parlodion is generally used). The directions for use, enclosed in the tins, are not entirely correct and are apt to give much trouble to the beginner.

In the first place, this: „Jede Tafel enthält 40 g.reine trockene Celloidinwolle; den Gewichtsrest bildet Alkohol“. As far as I know, the weight of the dry celloidin is never 40 g. and is sometimes even less than 35 g. One should know this, especially when estimating the number of tins to be opened.

Much worse is the fact that apart from alcohol, there is always a certain amount of water in the tablets of celloidin. For this reason it is necessary to divide them into small pieces and dry them thoroughly. Most people cut them into pieces but I prefer another procedure: the tablet is shredded on a carpenter's plane placed upside down. Thus in a few minutes the whole tablet is divided into a great number of thin ribbons, which dry rapidly. For this purpose they are placed in a dish, covered with paper and before they are wholly dry they are cut into small pieces with a pair of scissors. In this way the celloidin is obtained in an excellent shape. If necessary the material can afterwards be dried on a radiator for some time. One should cut and dry only about the quantity of celloidin immediately needed. Whenever the whole tablet is not used, the rest of it should be cut into several pieces and kept in tight cylinder glasses, to avoid the evaporation of the alcohol. When larger pieces are dried in the air, they are very difficult to cut. Dry chips and remaining fragments should be kept under water. Celloidin is nitrocellulose and although under ordinary conditions there is no serious danger of explosions, it is recommended that all risk be avoided by delaying chemical changes in this way.

The dry celloidin is next dissolved in equal parts of ether and alcohol, both of best quality and anhydrous. I make up stock solutions of from 2 to 14 per cent, keeping them in wide-mouth bottles (of about 300 or 400 c. c.) and stoppered with corks of best quality. If the celloidin is very slow in dissolving (especially in the higher concentrations) the process may be hastened by clenching the bottle in an iron clip and putting it upside down in a thermostat with a temperature of 40° to 50° C., taking care that there is no leak through the cork.

Besides these stock bottles, small, wide-mouth bottles also closed with corks of best quality are needed. The material is put from the absolute alcohol into a small bottle with the 2 per cent celloidin solution, and placed in the thermostat. JEFFREY fixes the cork „by twisting tough wire about the neck

of the bottle in such a manner as to provide two short and diametrically opposite loops". In my opinion it is more convenient to put the bottle in a simple iron clip. Such clips may easily be cut from sheet-iron of about 0.7 or 0.8 m.m. The bottle can be put in and taken from it very easily and if the clip be somewhat wide, the cork can be pressed firmly into the neck by putting one or two small wooden wedges between the top and the clip.

As to the best *temperature* for the infiltration there seems to be some difference of opinion. According to EAMES it is generally desirable to raise the temperature to 55° or 65° C. JEFFREY prefers a temperature of 40° to 45° C. and he is convinced that higher temperatures are rather unfavourable. My own experience is insufficient to decide upon this point.

I allow the material to remain for 24 hours in the 2 % solution. The bottle is then cooled (as by putting it outside on the windowsill), the solution returned to the stock bottle, 4 % solution poured on the material, and the bottle again placed in the thermostat this time for twelve hours. This process is continued until 14 % is reached. It is not recommended to go higher than 14 % with the solutions, for the higher concentrations are very unmanageable. It is better to use dry chips of celloidin to thicken the solution. For this purpose small chips of celloidin are added each twelve hours until the solution will barely flow when cold, taking care not to place the chips close to the pieces of material; if necessary the latter may be protected by pieces of stout paper. The infiltration process may be interrupted at any stage and the partly infiltrated material set aside. Prolonged heating renders celloidin insoluble, hence material should not be left much over twelve hours in each solution. Finally the pieces of material are removed with forceps, taking care that each has a thick coat of celloidin; each piece is dipped into chloroform for a few seconds, removed from the forceps, and allowed to remain in the chloroform for from 6 to 12 hours. It can be kept indefinitely in equal parts of glycerine and 50 % alcohol. JEFFREY found objects stored in this way, in good condition after an interval of twenty years.

4. SECTIONING.

A strongly-built, sliding type of microtome is a necessity in the cutting of this kind of celloidin material; the knives should be extremely hard and sharp. My experience is restricted to the instruments supplied for this purpose by R. JUNG (Heidelberg) and to the THOMSON-JEFFREY sliding microtome supplied by the BAUSCH and LOMB optical Company of Rochester, N. Y.

Apart from some subordinate details, I found the F 5 microtome of JUNG very satisfactory. This microtome is no longer supplied being replaced by the type H which shows some important improvements:

1. The object-holder is placed in a hemispherical cavity, in which it can very easily be given any desired position by means of two screws, and then can be perfectly fixed by an eccentric-mechanism.

2. The object-holder is placed on a massive cylinder, which can be moved up and down in a thick jacket.

All these parts are built very solidly, making for great stability of the object-holder.

3. The coarse adjustment is performed by a handle (in the F 5 type this was done by a lever).

4. The movable parts of the object-holder are protected by a small tray with outlet tube; this is very serviceable especially when working with a dripping apparatus.

For a knife-holder, those mentioned under Nos. 206 and 207 are recommended; with either of these, the knife can be turned in the horizontal plane.

Fixing the material in the microtome.

The objectcarrier of this microtome consists of a clamp device, in which a small block can be screwed between two metal plates.

The object can be fastened in either of two ways:

- a) it can be fastened to a piece of wood and this clamped in the carrier, or
 - b) the object itself can be clamped in the carrier.
- a) In general, small objects (the base being relatively large in relation to the length) may be fixed on a piece of wood; JEFFREY recommends for this purpose rather coarse-grained, dicotyledonous wood. The upper surface should be smooth and should be varnished with celloidin by dipping it in a 4 per cent solution and letting it dry. If the blocks are being used for the first time, this should be repeated *once more*. Then the object with its coat of celloidin is taken from the glycerine-alcohol, wiped and trimmed; the base, parallel to the desired sections should be perfectly flat. Now this is dipped in 6 per cent celloidin solution, pressed on the prepared surface of the wooden blocks and placed aside for about a quarter of an hour, after which the block can be clamped in the object-carrier (JEFFREY).
- b) Objects that are relatively long, for instance parts of branches must be clamped directly in the object-carrier. For this purpose I use a small wooden block in which an opening has been bored and which has then been divided into halves. If a series of such blocks is made with different sized holes, it is always possible to have one that approximately fits the material.

Often it is desirable to choose one with the hole somewhat wide putting thin cork strips in it. The object can be firmly clamped in these blocks without injury. Of course, in such cases, only the part above the blocks can be sectioned.

Sectioning itself is largely a matter of routine and practice and directions can scarcely be given. The following suggestions may perhaps be useful: During the process of sectioning, the surface of the knife as well as the material, should be kept wet with 90—95 % alcohol. This may be effected by the brush which is used for preventing the curling of sections and for taking them from the knife, or with a dripping apparatus. I prefer the latter, because the quantity of fluid on the knife can be better regulated in this way. Dripping appliances which are regulated by air pressure, are supplied by JUNG, but they can easily be made from a glass reservoir and a rubber tube with a thumb-screw. Particularly if serial sections are desired, it is recommended that a dripping apparatus be used. Another advantage is, that if necessary the object can be left for some time in the microtome without danger of drying out.

The position of the knife is a matter to be determined by experience. Generally the knife should make an acute angle with the line of motion, so that it is drawn through the object with a long, sliding stroke. In knife carriers Nos. 206 and 207 of JUNG, the position of the knife in respect to the horizontal plane can easily be changed. The knife should be in an oblique position, the inclination generally somewhat acute (about 10 degrees according to PLOWMAN). JEFFREY considers a more oblique position to be sometimes advantageous, especially when large objects or those which are likely to curl are to be sectioned. The knife is flooded with alcohol and the wet brush is placed on the top of the object; then a slow, steady motion is given to the knife. The section is removed from the knife by the brush or with brush and spatula and put into 95 % alcohol. If the sections tend to curl after being placed in the alcohol, this may be avoided, according to JEFFREY, by allowing

them to become nearly dry on the surface of the knife at some distance from the part of the edge being used for cutting. If it is desirable to have all the sections in series for a preliminary examination, I prefer to use a mixture of glycerine and alcohol for the dripping fluid, placing the sections on large slides as soon as cut.

The thickness of the section is determined by the purpose for which it is to be used. For anatomical work $10\ \mu$ is generally thin enough, and even for microphotography this may do in many cases.

5. MOUNTING, STAINING ETC.

Subsequent procedure depends upon the purpose to which the material is to be put. If it is desired to study only individual sections, the sections may be placed in a watch glass to be examined with a hand lens so that the desired sections can be picked out. If this method is not sufficiently exact, the sections may be placed in series on a slide in glycerine, where they can be examined under the low power of the microscope. In many cases these unstained sections lend themselves very well to study, and in some cases they are preferable to stained ones.

To preserve serial sections in glycerine, it is a good idea to put a cover glass on the slide. I use for this purpose large slides (87×37 mm.), with large cover glasses (45×36 mm.). If some carbolic acid is added to the glycerine, such series can be kept for a long time. I put them in wooden boxes made of threeply material with the frame made of thin laths. In my boxes, two rows of ten slides each can be placed; the boxes can be piled one on another and easily stored.

For *staining* and *mounting* of separate sections, the usual methods can be employed. The celloidin may be left in the sections permanently, even if microphotographs are desired. (In such cases a little chloroform must be placed in the absolute alcohol when dehydrating.) This is of great advantage in those cases in which sections are apt to fall apart when the celloidin is removed. Care should be taken, that the celloidin is stained as little as possible. It is usually advisable, however, to remove the celloidin with ether, preferably after staining, either before treatment with absolute alcohol or immediately afterwards.

For anatomical work a double staining with haematoxylin and saffranin is often very satisfactory (CHAMBERLAIN, p. 124). Either HEIDENHAIN's method with the mordant and the stain separated, or DELAFIELD's method, may be used. The first is often recommended where microphotographs are desired, as this method gives sections with sharply-contrasting, deep colours. However, DELAFIELD also has its advantages. CHAMBERLAIN recommends it strongly: „When ever you are in doubt as to the selection of a stain for general purposes, we should advise the use of DELAFIELD's haematoxylin". Well-ripened haematoxylin should be used, and DELAFIELD's is most convenient since it does not deteriorate after once ripened; I find it often gives very satisfactory results for photographic work. According to CHAMBERLAIN, cellulose walls are brought out even better with DELAFIELD's than with HEIDENHAIN's and consequently it is a very good stain for embryos and fundamental tissue in general. Saffranin which stains lignified and suberized walls a bright red, forms an excellent counter stain for anatomical purposes.

Staining in HEIDENHAIN's may well be done according to the following schedule (EAMES):

1. Iron alum solution about 3 per cent, for a few minutes (JEFFREY says 10—15 minutes).

2. Wash thoroughly, changing the water three times. („In material containing a great deal of tannin special precautions must be taken to insure thorough washing by repeated changes of distilled water"; JEFFREY).
3. Staining in haematoxylin. A stock solution is made of 1 % crystals in absolute alcohol or of $\frac{1}{4}$ % in water. A few drops are added to a watch glass of water, and the section is left here until it is sufficiently blue.
4. Staining in saffranin. A stock solution is made, as for instance, a saturated solution of the alcohol-soluble saffranin, in 95 % alcohol. A few drops of the stock solution are added to a watch glass of water. The section is removed from the haematoxylin, allowed to remain in water for a moment, and then in the watch glass with the saffranin for 2 to 5 minutes or more.
5. Dehydrating. The section is washed in water (once) and next run up quickly through the alcohols: 50, 70, 95 (or the lower grades omitted) and 100 %. (Ethyl alcohol is preferable to methyl, especially the absolute). The stain comes out readily in the 70 % and 95 % alcohols; if the staining was too strong a longer treatment can be given in these. The section must be dehydrated thoroughly in absolute ethyl alcohol, in which only a very little destaining takes place.
6. Removal of the celloidin by placing the section in ether for some minutes.
7. Benzol.
8. Mount in balsam in benzol.

This rather simple procedure gives very satisfactory results for separate sections.

6. SERIAL WORK.

No doubt, the celloidin method is slow and tedious, yet often the results are very satisfactory. From my own experience the greatest difficulties arise if we try to apply it to serial work. However, in many cases, complete series are of prime importance in anatomical research.

The application of the celloidin method to serial work has been tried in different ways. In the first place, we can make glycerine series as already has been described, p. 25, selecting separate sections for staining and mounting.

Making serial mounts has been tried by:

1. PLOWMAN, working in JEFFREY's laboratory (1904).
2. A. S. FOSTER (1926).
3. C. F. SWINGLE (1927).

SWINGLE used „the double embedded method". His celloidin material, after being hardened in chloroform and put into xylol (which was changed several times) was embedded in paraffin. „This made it possible to cut serial sections on a rotary microtome and to get sections of 8 to 10 microns in thickness of apple stems 10 years old. By putting the ribbons containing the sections on the slide and keeping them in place with mosquito netting, tied on with thread, it was possible to stain in series on the slide".

I have not yet tried this method. Possibly it may be useful for general topographic work, but I am sceptical whether it can give satisfactory results for exact studies of plant tissues and organs. What I saw of SWINGLE's results did not convince me in this respect.

Another method for serial celloidin sections has been recently devised by A. S. FOSTER (1926), who has kindly furnished me with the following additional suggestions regarding his procedure:

1. The celloidin ball should be evenly „squared" preparatory to sectioning, as perfectly rectangular sections are necessary in order to form the „strips".

2. Every trace of alcohol should be removed from the sections on the slide by carefully pressing a piece of filter paper upon them. Only a little practice is necessary in order to avoid removing any of the sections on the paper. If this happens, replace the sections, flood the slide with 70 % alcohol, and margins of the strip.

3. In forming the strips, a very dilute solution of celloidin (2 %) should be used and kept in a tightly stopped bottle. Care should be taken to make sure, quick strokes between the sections and to avoid „painting” beyond the margins of the strip.

4. Properly made strips can be removed repeatedly from the stain or the alcohols and examined on a glass plate under the microscope. If the strips tend to break up the „painting” should be done more carefully and in some cases it may be well to leave the strips in 70 % alcohol for several days before attempting to stain.

5. Clove oil cannot be used as a clearing agent with this method for it acts as a solvent of the celloidin matrix. Staining schedules however, which employ xylol rather than clove oil should prove satisfactory.

6. An obvious advantage of this method lies in the fact that fairly thick woody sections may be stained in serial order free in the staining fluid

Dr. FOSTER seems to have had very satisfactory results with this method and several other investigators at the Bussey Institution found the method of considerable value.

My own experience is restricted to the method described by PLOWMAN in 1904. He gives these directions: „The sections are cut in the following mixture: 90 per cent alcohol 85 parts, glycerine 15 parts. As the sections are cut they are to be arranged on a piece of smooth, thin paper. As soon as the alcohol has evaporated from the sections, turn the slip of paper face down upon a slide which has been coated with albumen fixative, add several layers of paper, and press the whole firmly down upon the slide by means of a photographic squeegee roller; then put another slide on top of the layers of paper, clamp all together by suitable spring clips, and place in the paraffin bath to dry for not more than twelve hours. A longer time than this renders the celloidin more or less insoluble. The paper may now be stripped off, leaving the sections firmly attached to the slide. Pass the slide through alcohol, ether, stain etc., as with separate sections”.

I used this method for some time and I got the impression that excellent results can be obtained in this way. I made series of soft wood (*Salix*); the sections were 10 μ thick and they were stained on the slide according to the schedules given by CHAMBERLAIN [p. 122]. I had no trouble with the sections dropping off during the staining process, though this is the greatest difficulty of the method, especially when working with the harder woods. If the sections tend to curl during the cutting process, there is a great chance that the majority of them will drop off during staining. To prevent this, the demineralization process should be prolonged in order to soften the material thoroughly, and a thicker coat of albumen fixative should be used then is employed for paraffin work. Of course another means to prevent this trouble is to make the sections as thin as possible, but as a rule it is very difficult to make them thinner than 5 microns.

Just as we are going to press, another method for serial work is presented by E. ELEANOR CAROTHERS (in „Science”, Vol. LXVII, p. 400—401, April 1928): The collodion method and serial sections.

PLAAT I.

- Fig. 1. Dwarse doorsnede door een wortelbeginsel van *Ribes nigrum*, in een eenjarigen tak (vergr. 80 ×).
- Fig. 2. Tangentiale doorsnede door een dergelijk wortelbeginsel (vergr. 80 ×).

Beide microphotographieën zijn naar celloidine-coupees van 10 μ ; kleuring met haematoxyline en saffranine.

PLATE I.

- Fig. 1. Cross section through a root-germ of *Ribes nigrum*, in a one-year-old branch (enlargement 80 ×).
- Fig. 2. Tangential section through such a root-germ (enlargement 80 ×).

Remark: Celloidin sections are not always quite as well flattened as paraffin sections are. In making microphotographs this can be a great inconvenience. Here is a suggestion for overcoming this difficulty:

An hour or so before the slide is to be photographed, two wooden spring clamps are fastened upon it and the slide placed in the electric oven (about 55° C.) Care should be taken to place small discs of cork between the cover glass and the clamps. The pressure of the clamps plus the heat of the oven is usually sufficient to completely flatten the sections in a short time. Some of the balsam inevitably oozes out and care should be taken in removing the clamps that air does not enter (Foster).

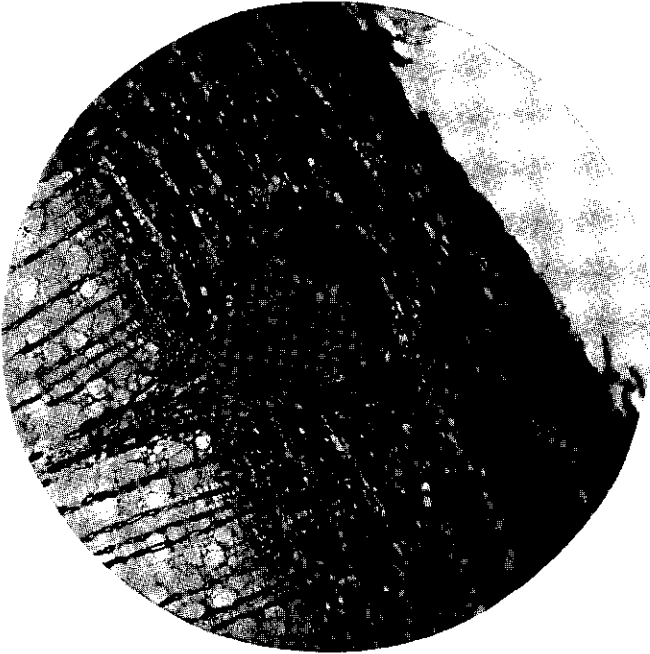


Fig. 1.



Fig. 2.

PLAAT II.

- Fig. 1. Slede microtoom H₃, van R. Jung; speciaal gebouwd voor het snijden van harde weefsels. (Zie de beschrijving op bldz. 10).
- Fig. 2 en fig. 3. De beide messenhouders (no. 207 en 206), waarbij de stand van het mes zich nauwkeurig laat regelen.

PLATE II.

- Fig. 1. Sliding microtome H₃, supplied by R. Jung; built for sectioning hard tissues. (See description, p. 23.)
- Fig. 2 and fig. 3. Knife holders nos. 207 and 206, in which the knife can be turned in the horizontal plane.

