Overdruk uit: Mededelingen Directeur van de Tuinbouw 14, 1951: 363–371

IR J. P. H. VAN DER WANT[1])

DE ELECTRONENMICROSCOOP

en zijn betekenis

voor biologisch onderzoek

Sedert enige jaren wordt ook in Nederland gebruik gemaakt van de electronenmicroscoop ten behoeve van velerlei onderzoekingen. Eerst stond alleen het apparaat van de Technisch Physische Dienst T.N.O. en T.H. te Delft, dat daar gedurende de oorlogsjaren was gebouwd, ter beschikking. Doch sedert de Philips Fabrieken te Eindhoven electronenmicroscopen in serie vervaardigen, zijn er thans enkele in andere centra van onderzoek hier te lande opgesteld. Aangaande Wageningen zijn de plannen tot plaatsing van een dergelijk instrument, dat bij zal kunnen dragen tot het onderzoek voor land- en tuinbouw in velerlei geleding, in een vergevorderd stadium. Met het oog hierop zullen in dit artikel enige bijzonderheden worden medegedeeld over de electronenmicroscoop zelf, over verschillende technieken, die voor het vervaardigen van preparaten van biologische objecten voor electronenmicroscopisch onderzoek kunnen worden gevolgd en over enkele resultaten, die met dit moderne instrument op biologisch gebied reeds werden bereikt. De grote mogelijkheden van toepassing van de electronenmicroscoop liggen niet uitsluitend op het terrein van het biologisch onderzoek; ook voor chemie en bodemkunde bijv. is hij van zeer grote betekenis. Het hier te behandelen onderwerp vergt evenwel beperking.

Ondanks het feit, dat de electronenmicroscoop eigenlijk pas de laatste tien jaren in gebruik is, is de hoeveelheid publicaties aangaande toepassing er van voor botanisch,

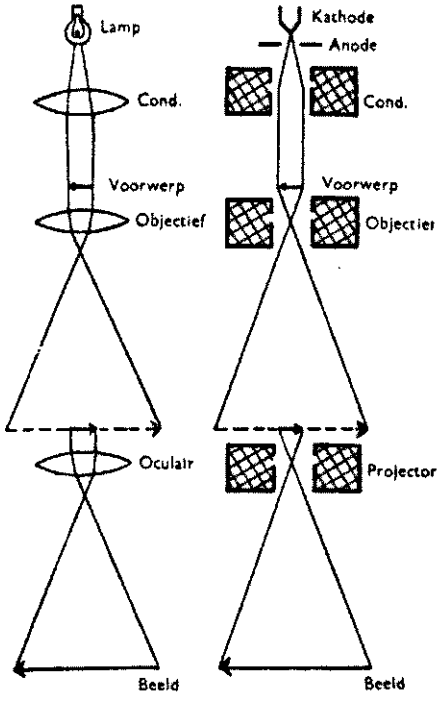


Fig. 1. Schematische voorstelling van de gang van de lichtstralen in een lichtmicroscoop (links) en van de electronenstralen in een electromagnetische electronenmicroscoop (rechts). Cond. = condensor. Naar Wyckoff (9).

[1]) Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen.

zoölogisch en virologisch onderzoek uitermate groot. Vele dezer artikelen zijn te vinden in een bibliografie (6) door het United States Department of Commerce uitgegeven. Uitvoerige gegevens over de electronenmicroscoop en zijn toepassingen zijn beschreven in enkele publicaties (4, 7, 9), die in de hier achter gevoegde literatuurlijst zijn opgenomen.

DE ELECTRONENMICROSCOOP EN ZIJN BOUW

Naar men weet is in de microscopie het zgn. oplossend vermogen en niet in de allereerste plaats de vergroting van wezenlijke betekenis. Onder oplossend vermogen wordt verstaan de kleinste afstand tussen twee punten, welke wij nog als afzonderlijke punten met de microscoop kunnen waarnemen. Liggen twee punten dichter bij elkaar dan het oplossend vermogen toestaat, dan kunnen wij deze punten niet gescheiden zien, al vergroten wij nog zo sterk. Evenzo wordt een voorwerp niet waargenomen als een der afmetingen kleiner is dan het oplossend vermogen van de microscoop.

Volgens ABBE is dit oplossend vermogen rechtstreeks afhankelijk van de golflengte van het gebruikte licht. Is de microscoop met de beste lenzenstelsels uitgerust en past men cederolie toe als medium tussen object en objectief dan ligt de grens van het oplossend vermogen voor wit licht bij circa 300 mμ. Gebruikt men ultraviolet licht, hetgeen de toepassing van kwartslenzen noodzakelijk maakt, dan ligt deze grens ongeveer bij 100 mμ.

De lichtmicroscoop laat ons dus in alle opzichten in de steek waar het er om gaat kleinere deeltjes of fijnere structuren waar te nemen.

Na de belangrijke theoretische onderzoekingen van de Franse natuurkundige DE BROGLIE in de twintiger jaren van deze eeuw, werd de aandacht op electronenstralen gevestigd. Deze hebben een golflengte, die afhankelijk is van de snelheid der electronen; de golflengte wordt kleiner bij toenemende snelheid. Men drukt de snelheid van de electronen uit in het potentiaalverschil tussen de kathode (die de electronen uitzendt) en de doorboorde anode (waar de electronen doorheen schieten). Bij een potentiaalverschil van 50 000 Volt is de golflengte ongeveer 0,005 mμ (circa 100 000 maal kleiner dan de gemiddelde golflengte van wit licht!).

Het duurde evenwel enige tijd eer men deze kortgolvige electronenstralen in een microscoop kon toepassen. Eerst moesten geschikte lenzen worden geconstrueerd en velerlei andere technische problemen worden opgelost. BUSCH toonde in 1926 aan, dat een magnetisch of electrostatisch veld van geschikte vorm als lens kan worden gebruikt om een electronenstraal te breken en dat aldus een vergroot beeld van de kathode kan worden gevormd.

Vooral de Duitsers hebben zich sedert 1930 veel moeite gegeven een electronenmicroscoop te bouwen. Later werden ook in andere landen pogingen dienaangaande in het werk gesteld. Het resultaat is, dat thans verschillende typen electronenmicroscopen voorkomen, welke in principe niet, doch in technische uitvoering wel belangrijk van elkaar verschillen.

De gang van een electronenstraal in een electronenmicroscoop is te vergelijken met de gang van een lichtstraal in een lichtmicroscoop; op analoge wijze wordt een vergroot beeld van het

object gevormd. Zoals lichtstralen door glazen lenzen worden gebroken, zo breken electromagnetische of electrostatische velden electronenstralen. Naar aanleiding hiervan wordt in de electronenmicroscopie dan ook van condensor- en objectieflenzen gesproken; in plaats van oculair gebruikt men evenwel liever het woord projectorlens, aangezien deze het beeld (dat met het oog niet is waar te nemen) op een scherm, bestreken met een fluorescerende substantie, projecteert. Onder invloed der electronenstralen gaat deze stof meer of minder sterk oplichten.

Men gebruikt het scherm om op scherp te stellen. Ten gevolge van onregelmatigheden op dit scherm is het beeld niet zo fraai, dat men er rechtstreeks nauwkeurige waarnemingen aan kan verrichten. Men neemt daartoe en tevens voor documentatie, na scherpstelling, het beeld op een fotografische plaat of film op.

De electronenstralen dienen in hoog vacuum te lopen, aangezien botsing met de moleculen van de lucht de gang der stralen verstoort. Het object moet eveneens in dit vacuum verblijven, hetgeen medebrengt, dat slechts van droge objecten afbeeldingen kunnen worden gemaakt.

Het oplossend vermogen van de electronenmicroscoop variëert tussen circa 10 en 20 mμ. Dit is ongeveer 200 tot 400 maal de golflengte van electronenstralen met een snelheid van 50 000 Volt (zie boven). Onvolkomenheden in de lenzen zijn er onder meer oorzaak van, dat het oplossend vermogen van deze microscopen met betrekking tot de golflengte der gebruikte electronenstralen relatief geringer is dan dat van een lichtmicroscoop.

Fig. 2. Electronenmicroscoop, gebouwd op het Laboratorium voor Technische Physica te Delft. (Foto Technisch Physische Dienst T.N.O. en T.H., afd. Electronenmicroscoop).

De dikte en de massa van het preparaat bepalen hoeveel electronen er doorheen kunnen dringen, zonder dat zij op ongewenste wijze worden verstrooid. Immers, is het preparaat te dik of is de massa te groot, dan kunnen geen of te weinig electronen doordringen om een behoorlijk beeld te geven. Deze grens wordt bij zware metaaldeeltjes van enige mμ doorsnede reeds bereikt; bij biologische objecten ligt de grens hoger, n.l. in de buurt van de dikte van bacteriën. Bij het bestuderen van coupes moet hiermede rekening worden gehouden. Coupes dikker dan circa 1μ zijn in het algemeen voor electronenmicroscopisch onderzoek ongeschikt.

HET VERVAARDIGEN VAN PREPARATEN

De objecten moeten op uiterst dunne membranen worden gebracht ten einde de gang der electronenstralen zo min mogelijk in ongunstige zin te beïnvloeden.

De membranen zelf worden op membraanhouders gehecht. Van deze houders zijn, al naar het type microscoop, verschillende modellen in gebruik. In het apparaat van Philips passen kleine, dunne plaatjes, waarop in het midden een smalle streepvormige opening voorkomt. In de Verenigde Staten vinden vaak fijne metalen gaasjes van circa 3 mm in doorsnede toepassing.

De membranen worden doorgaans gemaakt van collodion of formvar, een plastic. De eenvoudigste wijze van vervaardiging is die waarbij een druppel van een dezer stoffen, opgelost in een geschikt oplosmiddel, op gedestilleerd water in een petrischaal wordt gebracht. Het oplosmiddel spreidt zich over het wateroppervlak uit, verdampt snel, en een uiterst dun vlies van collodion of formvar blijft achter. Er zijn verschillende methoden ontwikkeld om zo'n vliesje op de membraanhouder te hechten.

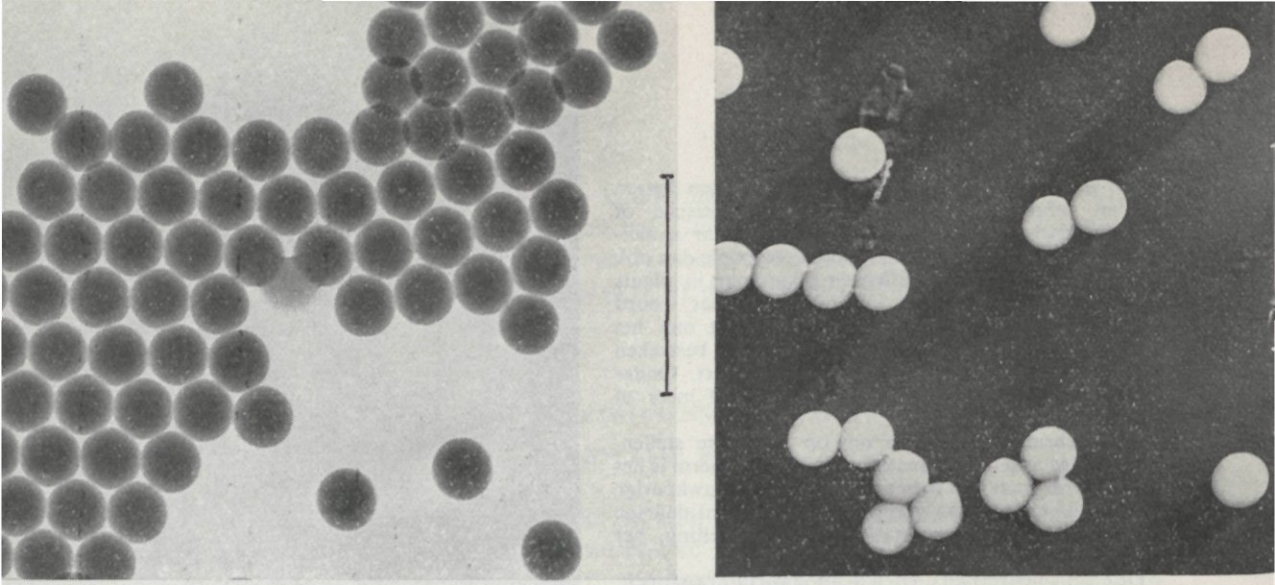


Fig. 3. Electronenmicroscopische opname van polystyreen-latexbolletjes.
Links: niet met metaal bestraald. Rechts: wel „geshadowcast".
Deze bolletjes zijn alle van gelijke grootte (254 mμ); men kan er gebruik van maken om de vergroting van een electronenmicroscoop te bepalen. De lengte der bijgeplaatste strepen stelt de afmeting van 1μ bij de gegeven vergroting voor.

De vliesjes, vervaardigd van een der twee genoemde stoffen, hebben doorgaans geen volkomen glad oppervlak, hetgeen sterker naar voren komt wanneer de straks te bespreken „shadowcasting" techniek wordt toegepast om meer contrast in het preparaat te leggen. Vliezen met gladdere oppervlakken kunnen o.m. worden verkregen door bepaalde metalen, als beryllium en aluminium in vacuum te verdampen en op het oppervlak van glycerine te laten neerslaan. Men kan dan een metaallaagje met een dikte van 2 tot 3 mμ verkrijgen, dat zo transparant is, dat het nauwelijks zichtbaar is in de electronenmicroscoop.

Zijn de vliesjes gemonteerd op de membraanhouders dan is het bevestigen van het preparaat hierop vrij eenvoudig. Wil men van een gezuiverd virus een electronenopname maken, dan kan men volstaan met een druppel van de virussuspensie op het membraan aan te brengen. Na indrogen is het preparaat gereed.

Deze methode kan ook gebruikt worden voor vervaardiging van preparaten van bacteriën en andere micro-organismen. Soms wordt evenwel een andere werkwijze toegepast, n.l. door de bacteriën zich te laten ontwikkelen op het vlies zelf. Men brengt een collodionmembraan op een steriele agarvoedingsbodem aan en ent hierop de bacteriën. Na enige uren kan een deel van het vlies worden verwijderd door een blokje uit de agar te snijden en dit in gedestilleerd water te brengen. Het vlies scheidt zich dan van de agar af en kan op een membraanhouder worden opgevangen. Men verkrijgt aldus op het membraan vastgehechte bacteriën in allerlei stadia van hun ontwikkeling.

Een bezwaar van de hier aangeduide technieken voor de bestudering van micro-organismen is, dat deze door het uitdrogen plat op het vlies komen te liggen en aldus een ander aspect geven dan zij in waterig milieu bezitten. Dit is een gevolg van de spanning aan het oppervlak van de indrogende waterdruppel. Door een zeer listig uitgedachte methode weet de Amerikaan ANDERSON,

die op het in September 1950 te Parijs gehouden congres over electronenmicroscopie hier mededelingen over deed, dit te ontgaan. De microben, die gefixeerd zijn (bijv. met osmiumzuur), worden tussen twee membranen van collodion aangebracht. Via mengsels van water en alcohol, waarbij de sterkte van de alcohol regelmatig toeneemt, worden zij in absolute alcohol gebracht en van daar via gelijksoortige mengsels alcohol-amylacetaat in zuivere amylacetaat. Vervolgens brengt men de microben in een kleine bom, welke bevestigd wordt aan een omgekeerde cylinder met vloeibaar koolzuur. Daarna laat men vloeibaar koolzuur door de bom stromen (deze bewerking geschiedt bij kamertemperatuur) en wast zodoende de amylacetaat uit het preparaat. De thans met koolzuur gevulde bom wordt tenslotte bij een temperatuur van circa 40° C gebracht, men laat het CO_2-gas ontsnappen en het preparaat is gereed voor onderzoek in de electronenmicroscoop. De listigheid van deze methode schuilt hierin, dat de kritische temperatuur van CO_2 bij circa 37° C ligt, d.w.z. boven deze temperatuur is geen vloeibaar koolzuur bestaanbaar. Met andere woorden, het in de bom bij kamertemperatuur aanwezige vloeibare koolzuur gaat bij verhoging van de temperatuur tot 40° C plotseling over in de gasfase, zonder dat er een grensvlak vloeistof-gasfase wordt gevormd, welk grensvlak door zijn oppervlaktespanning een platdrukkende werking op de bacteriecel kan uitoefenen. De bacteriën en andere microben worden dus niet zo plat als een pannekoek, doch behouden hun oorspronkelijke vorm.

De resultaten, die ANDERSON met deze methodiek heeft bereikt, waren zeer fraai. Merkwaardig is dat de preparaten, op deze wijze vervaardigd, veel contrastrijker zijn dan die welke op de oude manier worden gemaakt.

Er bestaat evenwel een belangrijke methode om meer contrast in de preparaten, welke men op de primitievere wijze van uitdroging heeft verkregen, aan te brengen, n.l. door de methode van „shadowcasting", die door de Amerikanen WILLIAMS en WYCKOFF werd gelanceerd. Volgens RUSKA (7) hebben, onafhankelijk van dezen, enkele Duitse onderzoekers gedurende de oorlogsjaren een gelijksoortige methode aangegeven. Vooral voor het duidelijker zichtbaar maken van macromoleculen, virusdeeltjes, flagellen van bacteriën, fijne structuren aan de buitenzijde van microorganismen e.d. vindt deze methode veelvuldig toepassing. Zij bestaat hierin, dat men het preparaat, reeds gemonteerd op membraan + membraanhouder, in vacuum met metaal bestraalt door een klein stukje metaal (bijv. goud, nikkel, chroom, palladium of uranium) tot gloeiing te brengen. Dit gaat nu metaalatomen uitzenden, zoals de zon lichtstralen. Wanneer men nu deze metaalstralen onder een schuine hoek op het object laat invallen, krijgt men aan de kant van het object, dat naar het gloeiende metaal is gekeerd een concentratie van metaaldeeltjes. Aan de andere zijde — de schaduwkant — worden echter geen metaaldeeltjes afgezet. Alle oneffenheden in het preparaat worden aldus door het metaal geaccentueerd. Het resultaat in de electronenmicroscoop is nu, dat op de plaatsen, waar geen metaal voorkomt, de electronen ongehinderd worden doorgelaten; waar zich het metaal in een meer of minder dikke laag bevindt, worden de electronen meer of minder sterk verstrooid, dan wel vastgehouden. Dit heeft tot gevolg, dat zij niet meer of althans in mindere mate bijdragen tot de beeldvorming. Anders gezegd, op de fotografische plaat verschijnen donkere partijen, die corresponderen met de plekken, waar geen metaal terecht kwam (de schaduwen) en lichte partijen, die overeenkomen met de plaatsen, waar wel metaal is afgezet. Immers, slechts waar electronen de fotografische plaat bereiken, heeft zwarting plaats. Terwille van het effect wordt van de aldus verkregen opname een afdruk op een nieuwe plaat of film gemaakt, welke als negatief dienst doet voor de vervaardiging van de uiteindelijke foto.

Bij het prepareren is er, o.m. ten gevolge van het uitdrogen zoals boven reeds werd aangeduid, veel kans, dat er belangrijke veranderingen in het object plaats

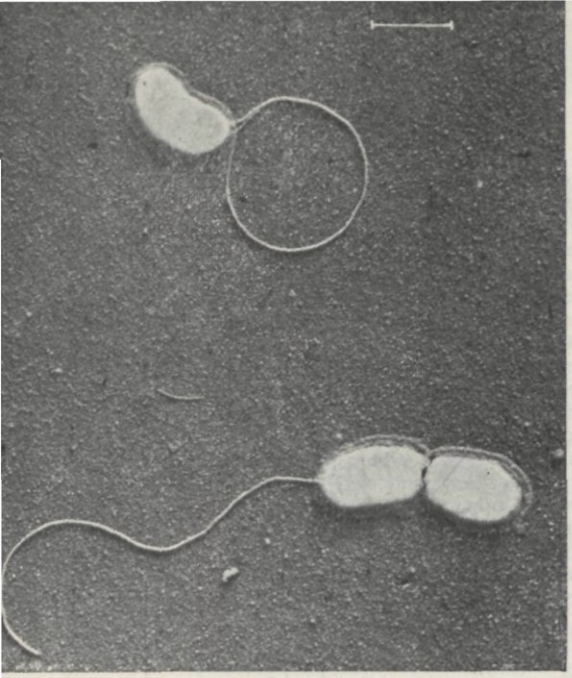


Fig. 4. Vibrio metschnikovii, een bacterie, pathogeen voor gevogelte. De streep is de lengte van 1μ bij de gegeven vergroting. (Foto Technisch Physische Dienst T.N.O. en T.H., afd. Electronenmicroscopie, Delft).

grijpen, ten gevolge waarvan het uiteindelijke beeld niet in overeenstemming is met de werkelijkheid. Bovendien kunnen in de electronenmicroscoop onder invloed van de electronenstralen veranderingen optreden. Zo heeft men waargenomen, dat gouddeeltjes, die als schaduwverlenend metaal zijn gebruikt, bij het electronenbombardement tot grovere partikels kunnen samenklonteren, daarbij soms tot merkwaardige structuren aanleiding gevend. Deze structuren zijn echter volslagen kunstproducten. Bij de interpretatie van electronenfoto's dient men dan ook zeer voorzichtig te zijn.

Een belangrijke prepareertechniek, die hier in het kort even genoemd moet worden, is die van de vervaardiging van replica's. Hierbij wordt het eigenlijke preparaat niet in de electronenmicroscoop bekeken, doch men maakt er eerst een afdruk van in daarvoor geschikt materiaal. Deze afdruk („replica") dient dan als object. Men heeft hier verschillende methoden voor bedacht, die in de geciteerde handboeken uitvoerig worden besproken. Deze techniek biedt grote perspectieven voor de bestudering van structuren aan de oppervlakken van moeilijk snijdbaar materiaal, als tanden, of bij het onderzoek van hout.

TOEPASSINGEN

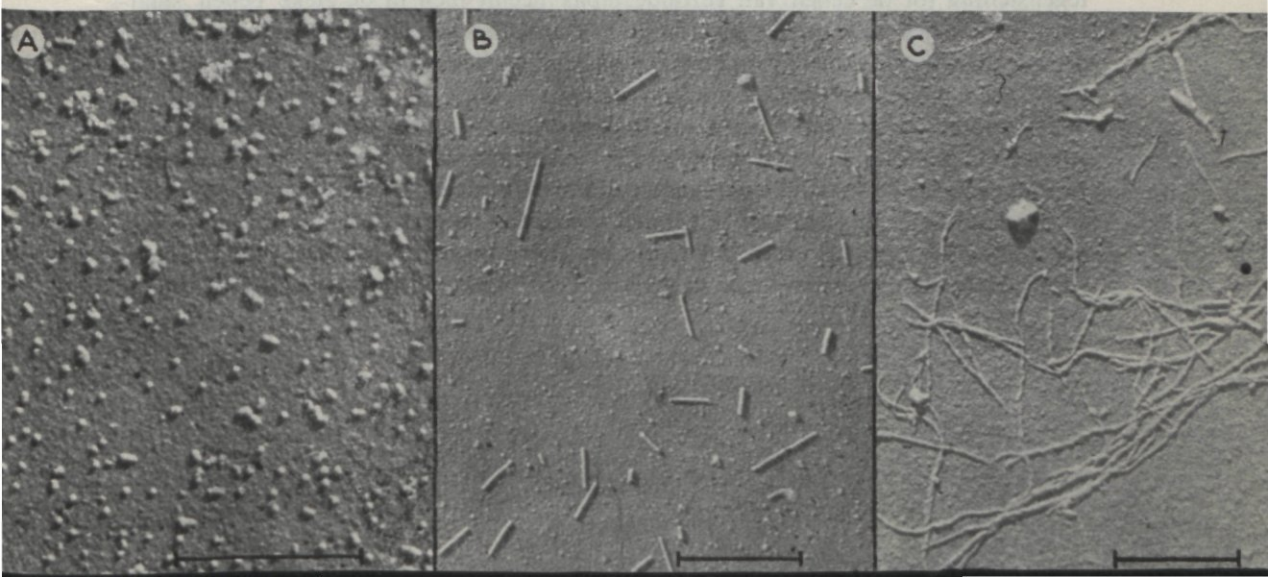
Van veel betekenis is de electronenmicroscoop voor de virologie geweest; nu pas was immers de mogelijkheid geboden een direct beeld van vorm en afmetingen van viren te verkrijgen. Weliswaar had men met behulp van verschillende indirecte methoden — in ultracentrifuge, met ultrafiltratie en met gepolariseerd licht — dienaangaande reeds belangrijke kennis verworven, maar toch had men nog geen duidelijke voorstelling van de afmetingen en bovenal van de vorm. Thans weten wij, dat er van de plantenviren minstens drie typen voorkomen, n.l. staafvormige (zoals bijv. tabaksmozaïekvirus), draadvormige (bijv. aardappel X-virus) en bolvormige (bijv. anjermozaïekvirus). In het algemeen zijn het de resistente viren die met sap kunnen worden overgebracht, waar men afbeeldingen van heeft kunnen vervaardigen. De minder stabiele viren zijn moeilijker te benaderen, terwijl men van de viren, die alleen door insecten kunnen worden overgebracht (op een in Amerika voorkomend virus na) nog in het geheel geen foto's heeft kunnen maken.

Men kan de resistente viren in het algemeen vrij gemakkelijk in het sap van zieke planten aantonen. Na afcentrifugeren van de chloroplasten en andere vaste bestanddelen kan het heldere sap, liefst in verdunning met gedestilleerd water op een vliesje

worden aangebracht. Dikwijls overheersen in dergelijke preparaten nog de verontreinigingen. Deze kan men voor verreweg het grootste deel verwijderen door het virus te zuiveren met ammoniumsulfaat. Men verkrijgt dan schonere preparaten en de foto's daarvan gemaakt zijn aantrekkelijker. Er zijn aan deze zuivering evenwel bezwaren verbonden, vooral ten aanzien van de staaf- en draadvormige virusdeeltjes. Er kan hierdoor n.l. aggregatie van deeltjes optreden, ten gevolge waarvan de lengte toeneemt en er dus min of meer een kunstproduct ontstaat. Door THUNG (8) is, om dit te ontgaan, een methode aangegeven die het mogelijk maakt het virus betrekkelijk zuiver op een snelle wijze uit de plant te isoleren, zonder dat verdere bewerkingen nodig zijn. JOHNSON (5) heeft deze methode op grote schaal bij de electronenmicroscopie van verschillende viren toegepast. Zij berust hierop, dat men een stengel of een blad van een viruszieke plant met het afgesneden einde aan een buis bevestigt, waarin men water onder druk brengt. Snijdt men vervolgens de stengel of het blad door, dan worden op de wondvlakte kristalheldere waterdruppeltjes uitgeperst, waarin zich virus bevindt. Men kan nu volstaan met zo'n druppeltje met een fijn pipetje op het vlies van de preparaathouder te brengen en daarop in te laten drogen. Eventueel kan het preparaat hierna nog enige keren met gedestilleerd water voorzichtig worden gewassen om oplosbare stoffen te verwijderen. De aan het vlies gehechte virusdeeltjes verdwijnen hierbij niet.

Een andere groep van viren, die uitvoerig met de electronenmicroscoop worden bestudeerd, zijn de bacteriophagen. Sommige bacteriophagen blijken een spermatozoïde-achtige vorm te bezitten; zij zijn n.l. bolvormig met een staafvormig aanhangsel. Dit aanhangsel werd in het begin algemeen als een soort van staart beschouwd, doch ANDERSON vond met zijn boven beschreven techniek van prepareren, dat het veeleer aanspraak maakt op de naam „snuit", aangezien coli-bacteriën, die kort tevoren met een phaag waren geënt, bezet bleken door phaagdeeltjes, die met het staafvormige einde als het ware vastgeprikt zaten in het bacterielichaam. Dit was met de oude wijze van prepareren nimmer waargenomen en het bewijst alweer dat een nieuwe methode tot verrassende ontdekkingen aanleiding kan geven.

Fig. 5. Een drietal plantenviren. A. anjermozaïekvirus (Foto vervaardigd met de electronenmicroscoop van Philips te Eindhoven); B. ratelvirus van de tabak; C. aardappel X-virus. (Foto's B en C vervaardigd met de electronenmicroscoop van de Technische Physische Dienst T.N.O. en T.H., afd. Electronenmicroscopie, Delft).



WYCKOFF (9) heeft het proces van de virusvermeerdering aan de hand van onderzoekingen over de bacteriophagen trachten te volgen. Op grond van zijn waarnemingen komt hij tot de opvatting, dat bacteriophagen veel gelijken op zeer kleine parasitaire microben, die zich ten kosten van het protoplasma vermeerderen.

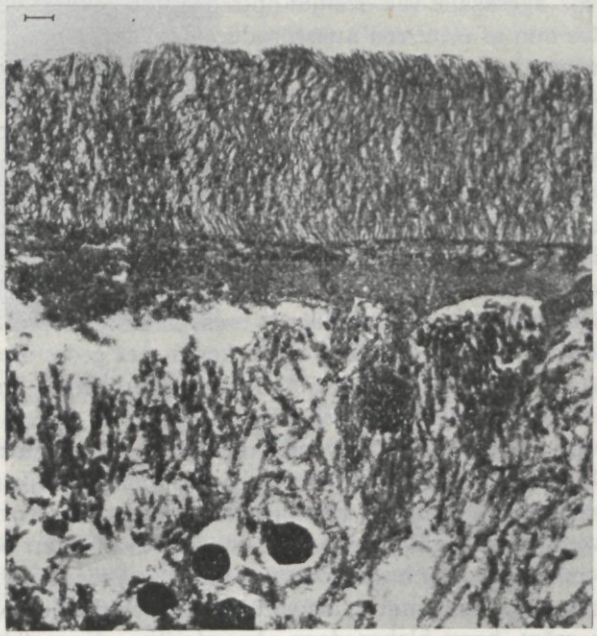


Fig. 6. Dwarse doorsnede door een epiteliumcel van de darmwand van Ascaris, een spoelworm. De coupe werd gemaakt door Dr L. H. Bretschneider te Utrecht; de foto is verkregen met de electronenmicroscoop van de Technische Physische Dienst T.N.O. en T.H., afd. Electronenmicroscopie, Delft.

Ook heeft men een begin gemaakt met het onderzoeken van het virus in de cellen van hogere planten. De eerste foto's van parenchymcellen van tabaksplanten, besmet met tabaksmozaïekvirus zijn door WYCKOFF en medewerkers (1) gepubliceerd. In tegenstelling tot de cellen van gezonde tabak neemt men in de zieke cellen staafvormige deeltjes waar, welke men identificeert als het virus. Grote ophopingen van deze deeltjes werden dikwijls in de chloroplasten gevonden. De celkern bleek daarentegen geen merkbare afwijkingen te vertonen.

Dit onderzoek aan cellen en weefsels vereist een bijzondere snijtechniek, daar de coupes minder dan 1 μ dik moeten zijn, willen aan de preparaten waarnemingen worden gedaan. In verschillende landen zijn hiertoe nieuwe microtomen ontwikkeld. In ons land heeft BRETSCHNEIDER (2) met succes een 60 jaar oud microtoom, dat op het Zoölogisch Laboratorium te Utrecht nog werd bewaard, gebruikt om er coupes voor electronenmicroscopie mee te maken. Een Engelse instrumentenfabriek maakt

thans een modern snijapparaat, dat volgens dit oude principe werkt. Hier kunnen sneetjes van 0,3 en 0,6 μ dik mee worden vervaardigd.

Van grote betekenis is ook de wijze, waarop het materiaal vóór het snijden wordt gefixeerd. BRETSCHNEIDER (3) onderzocht de invloed van 15 fixatievloeistoffen op het cytoplasma van meristeemcellen in de worteltop van de ui. Merkwaardig zijn de uiteenlopende beelden, die deze middelen geven. Sommige veroorzaken een sterke coagulatie van eiwitten, waarbij grove netachtige structuren ontstaan, die als kunstproducten moeten worden beschouwd. Gelukkig zijn er fixeermiddelen, die weinig ingrijpende veranderingen teweegbrengen.

Fraaie electronenfoto's werden reeds vervaardigd van chromosomen, al dan niet in deling verkerend. Voor de erfelijkheidsleer opent dit belangrijke perspectieven.

Ook aan dierlijke cellen is reeds veel onderzoek verricht, vooral met betrekking tot de vorm en de ontwikkeling van kankerachtige woekeringen.

NABESCHOUWING

Dit waren slechts enkele grepen uit de talloze toepassingen, die de electronenmicroscoop reeds heeft gevonden in het biologisch onderzoek. De grote betekenis, die dit instrument heeft, moge evenwel voldoende duidelijk zijn geworden.

Ook in het onderzoek, dat voor land- en tuinbouw van direct belang kan worden geacht, zal de electronenmicroscoop waardevolle bijdragen kunnen leveren. Denken wij slechts aan de plantenziektenkunde en aan de microbiologie.

Wanneer — naar wij hopen binnenkort — in Wageningen een electronenmicroscoop zal zijn geplaatst, dan zal ten behoeve van de Nederlandse land- en tuinbouw met dit apparaat een ruim arbeidsveld bestreken kunnen worden.

LITERATUUR

1. BLACK, L. M., C. MORGAN, R. W. G. WYCKOFF: Visualization of tobacco mosaic virus within infected cells. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 73, 1950: 119—122.
2. BRETSCHNEIDER, L. H.: Microtome sections of animal tissues. Proc. Conf. El. Microsc. Delft (1949), 1950: 104—105.
3. BRETSCHNEIDER, L.H.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Pflanzenzellen. Verh. Kon. Ned. Akad. Wetensch. **53**, 1950: 1476—1489.
4. GRÉGOIRE, C.: Microscope électronique et recherche biologique. Liège—Paris, 1950.
5. JOHNSON, J.: Virus particles in various plant species and tissues. Phytopath. **41**, 1951: 78—93.
6. MARTON, C., S. SASS, M. SWERDLOW, A. VAN BRONKHORST and H. MERYMAN: Bibliography of electron microscopy. U. S. Dep. Commerce, N.B.S. Circular 502, 1950.
7. RUSKA, H.: Die Elektronenmikroskopie in der Virusforschung. In R. DOERR und C. HALLAUER, Handbuch der Virusforschung, II. Ergänzungsband: 221—417, Wien 1950.
8. THUNG, T. H.: Waarnemingen over enkele plantenviren met het electronenmicroscoop. Chron. Nat. **104**, 1948: 344—348.
9. WYCKOFF, R. W. G.: Electron microscopy, technique and applications. New York 1949.