

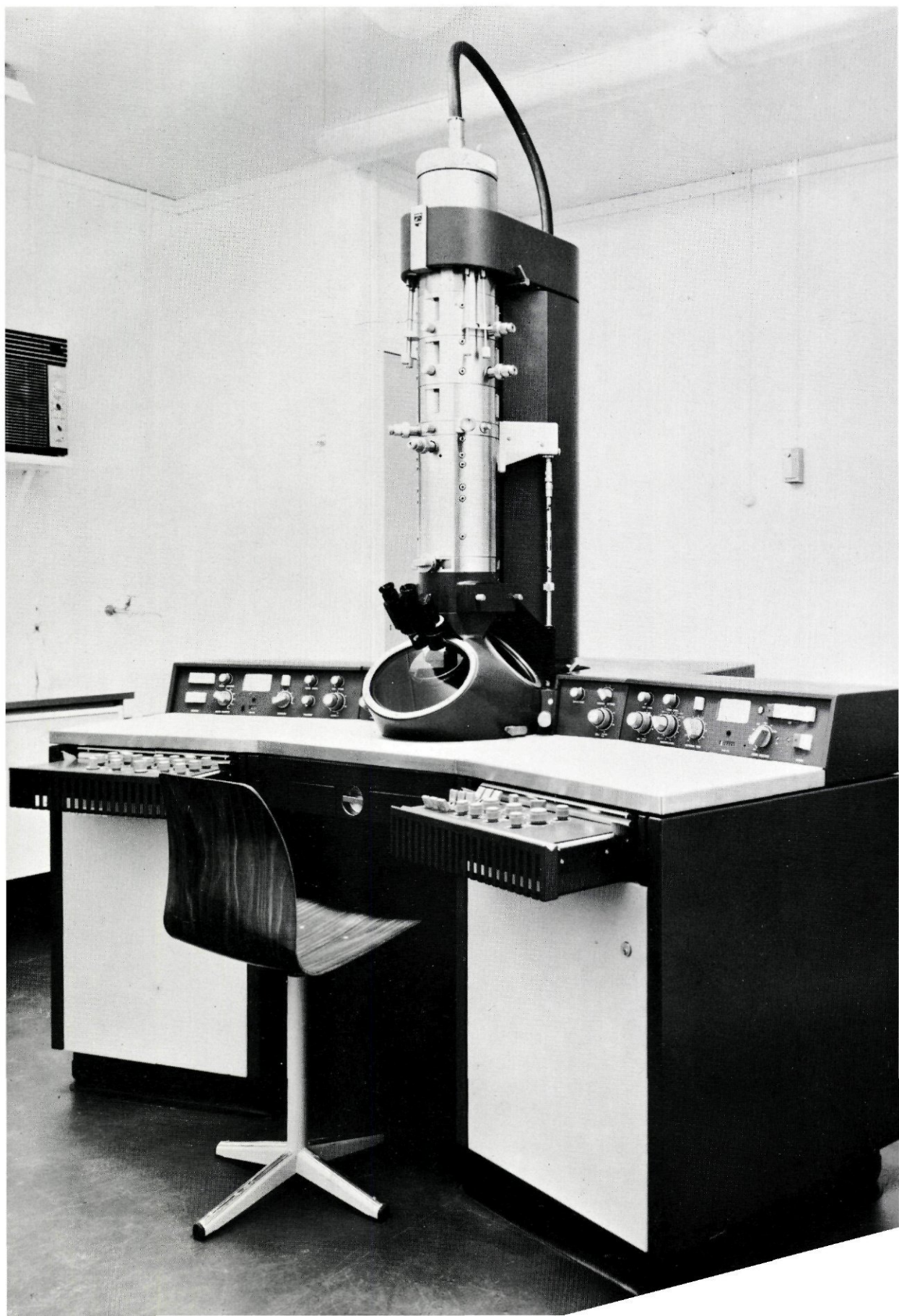
Mededelingen 9

10 jaar elektronenmicroscopische dienstverlening

SUPARAAT
No. 26696

BIBLIOTHEEK
INSTITUUT VOOR
ODEMYVRUCHTBAARHEID
GRONINGEN

128942



MEDEDELINGEN 9

10 jaar elektronenmicroscopische dienstverlening

Stichting Technische en Fysische Dienst voor de Landbouw
Wageningen

februari 1967

Fig.1 De Technische en Fysische Dienst voor de Landbouw beschikt sedert kort over het meest moderne elektronenmicroscop, de Philips EM 300 met een gegarandeerd oplossend vermogen van $5 \text{ \AA}$. De vergroting is instelbaar tussen 2800 x en 500.000 x, terwijl de hoogspanning is in te stellen op de waarden 20, 40, 60, 80 en 100 kV.

De samenstellers zijn bijzonder erkentelijk voor de medewerking van de opdrachtgevers/onderzoekers bij het totstandkomen van deze uitgave door het beschikbaar stellen van elektronenmicroscopische opnamen voor publikatie en door het mede opstellen van verschillende bijschriften.

Inhoud

1. BESTUUR	7
2. DE DIENSTVERLENING OP ELEKTRONENMICROSCOPISCH GEBIED	
Inleiding	8
De nieuwe organisatie van de elektronenmicroscopische dienstverlening	9
Cursussen	13
Doorberekening	13
Conclusies	15
3. ELEKTRONENMICROSCOPIE	
Historische ontwikkeling	16
Toepassingen	18
4. WERKZAAMHEDEN 1957 - 1967	23
5. GEPUBLICEERDE ONDERZOEKRESULTATEN	78

De Afdeling elektronenmicroscopie TFDL heeft ondermeer tot taak:

- het maken van elektronenmicroscopische preparaten met behulp van de bestaande technieken,
- het maken van elektronische preparaten met behulp van de bestaande technieken,
- het ontwikkelen van nieuwe prepareertechnieken,
- het maken van opnamen met het elektronenmicroscop EM 300,
- het toepassen van de noodzakelijke fotografische technieken bij het ontwikkelen, afdrukken en vergroten, waaronder microfotografie,
- het geven van voorlichting en instructie in het vervaardigen van preparaten in het bijzonder in de ultramicrotomie,
- het beschikbaar stellen van apparatuur ten behoeve van het onderzoek van submicroscopische structuren,
- het verlenen van medewerking bij de opleiding van analisten voor het bijvak elektronenmicroscopie voor de botanische richting.

Hoofd van de Afdeling: S.Henstra,

Dr. S.L.Mansholtlaan 12, Wageningen, telefoon 08370 - 4246

Bestuur

Ir. A.P.Minderhoud Voorzitter	Vertegenwoordiger van het Bestuur van de Landbouwhogeschool
Prof.Ir. G.J.Quast, Vice-voorzitter	Vertegenwoordiger van de Senaat van de Landbouwhogeschool
Mej.M.B. van Lennep, Secretaris	Vertegenwoordiger van de Nationale Raad Landbouwkundig Onderzoek TNO
M.Baars	Vertegenwoordiger van het Ministerie van Landbouw en Visserij
Prof.Dr. C.van den Berg	Vertegenwoordiger van de Instellingen voor Landbouwkundig Onderzoek
Ir. G.Groenendijk	Vertegenwoordiger van het Ministerie van Landbouw en Visserij
Ir. T.van Hiele	Vertegenwoordiger van de Instellingen voor Landbouwkundig Onderzoek
Dr.Ir. E.W.B.van den Muyzenberg	Vertegenwoordiger van de Instellingen voor Landbouwkundig Onderzoek
Prof.Ir. E.A.Vos	Vertegenwoordiger van de Senaat van de Landbouwhogeschool

Inleiding

Drs.A.M.K. van Beek - directeur

Op 1 januari 1957 begon de afdeling elektronenmicroscopie in Stichtingverband haar werkzaamheden ten behoeve van de Instellingen voor Landbouwkundig Onderzoek.

Aangezien de elektronenmicroscopie vooral toegepast werd bij het virus-onderzoek, werd de afdeling in maart 1960 ondergebracht in een gedeelte van de Afdeling Virologie van de Landbouwhogeschool.

Tot die datum had men de beschikking gehad over één microscoop, de Philips EM 100 en enige hulpapparatuur die door de Landbouwhogeschool waren aangeschaft en bij de oprichting van de Stichting in bruikleen werden overgedragen. De toenemende belangrijkheid van het zichtbaar maken van submicroscopische structuren bij het wetenschappelijk onderzoek, hadden er inmiddels toe geleid dat steeds betere elektronenmicroscopen door de industrie werden ontwikkeld. Ook het landbouwkundig onderzoek diende de beschikking te krijgen over een instrument met een hoog oplossend vermogen en het was dan ook bijzonder verheugend dat in 1960 het Siemens elektronenmicroscoop Elmiskop I kon worden geïnstalleerd.

Verdere uitbreiding van de hulpapparatuur vond plaats, zoals een schaduwapparaat van Balzers, een ultramicrotoom volgens Porter en Blum en later een LKB-ultramicrotoom. Nieuwe prepareertechnieken werden ontwikkeld en toegepast, internationale contacten werden gelegd en uitwisseling van gegevens geschiedde op verschillende internationale en nationale congressen. Ten behoeve van het onderzoek werden tienduizenden preparaten vervaardigd, duizenden opnamen gemaakt en zeer veel foto's van submicroscopische structuren aan de opdrachtgevers afgeleverd.

Aan het totstandkomen van verschillende proefschriften werd medewerking verleend, terwijl in vele publikaties foto's, door de afdeling gemaakt, werden opgenomen, zoals uit de lijst van publikaties moge blijken. Objectief kan thans worden geconstateerd, dat de elektronenmicroscopische dienstverlening zich in deze jaren heeft ontwikkeld tot een niveau dat met vele instellingen in binnen- en buitenland kan worden vergeleken en daardoor een waardevolle bijdrage aan het onderzoek van de submicroscopische structuren kon leveren. De tien jaren dienstverlening op elektronenmicroscopisch gebied vormen echter niet de enige aanleiding een publikatie hieraan te wijden.

De snelle toename van de gebruiksmogelijkheden van het elektronenmicros-

coop hadden tot gevolg dat de afdeling langzamerhand geheel overbezet raakte met onderzoekprojecten, die vaak vele jaren duren.

Hierdoor dreigde de dienstverlening op dit gebied ernstig te worden geschaad, zodat plannen zijn ontwikkeld, die de volledige instemming verkregen van het Ministerie van Landbouw en Visserij en van het Bestuur van de Landbouwhogeschool, tot algehele reorganisatie van het elektronenmicroscopisch onderzoek ten behoeve van de Instellingen in Wageningen. Dat de totstandkoming van de reorganisatie samenvalt met het tienjarig bestaan van de afdeling, is slechts een toevallige omstandigheid, maar biedt tevens de gelegenheid, naast een beschrijving van de nieuwe organisatie, ook een indruk te geven van de in de afgelopen jaren bereikte onderzoekresultaten. Naast enkele historische gegevens die een indruk geven van de stormachtige ontwikkeling op fysisch gebied, die leidde tot het eerste commerciële elektronenmicroscop in 1939 en enige algemene opmerkingen over de toepassingsmogelijkheden, worden in het tweede gedeelte van deze uitgave, samengesteld door mejuffrouw Drs.C. van der Scheer en de heer S.Henstra, de werkzaamheden over de afgelopen jaren aan de hand van enkele opnamen besproken.

De nieuwe organisatie van de elektronenmicroscopische dienstverlening

Zoals reeds boven werd opgemerkt, had de sterke toename van het virusonderzoek tot gevolg dat vele, meerdere jaren durende, onderzoeken in samenwerking met de afdeling werden opgezet. Vooral de lange duur van de projecten was er echter de oorzaak van dat de afdeling reeds veel van de beschikbare werktijd lange tijd van te voren had moeten reserveren, om de continuïteit van het onderzoek te waarborgen. Op deze wijze voortgaande zou het binnen enkele jaren vrijwel onmogelijk zijn andere opdrachten, vaak met een korte looptijd, snel uit te voeren.

Een oplossing voor dit probleem werd gevonden door een splitsing van de elektronenmicroscopische werkzaamheden tot stand te brengen.

De afdeling Virologie van de Landbouwhogeschool zal bij deze opzet het eigen onderzoek gaan uitvoeren met behulp van een eigen afdeling elektronenmicroscopie.

Om de voortgang van het onderzoek niet door de reorganisatie te schaden, zullen de beide microscopen van de Dienst overgedragen worden aan de Afdeling Virologie, terwijl één van de ter zake deskundige onderzoekers van onze Dienst, mejuffrouw Van der Scheer, overgaat naar deze Afdeling. Op deze wijze zullen de elektronenmicroscopen volledig dienstbaar kunnen worden gemaakt aan het fundamenteel onderzoek, terwijl bovendien de overdracht van een gedeelte van de in de afgelopen jaren verworven kennis een



garantie vormen voor een voortzetting van de elektronenmicroscopische werkzaamheden op het niveau dat door de afdeling werd bereikt.

De dienstverlening voor de andere Instellingen zal door de Dienst op een meer effectieve wijze worden voortgezet in een nieuwe afdeling, die wordt gehuisvest in het gebouw van de Dienst, Dr.S.L.Mansholtlaan 12.

Niet alleen zullen de werkzaamheden sneller kunnen worden uitgevoerd als gevolg van een vermindering van het aantal meer-jarige onderzoekprojecten, maar bovenal door de aanschaffing van het meest moderne elektronenmicroscop, de Philips EM 300, afgebeeld in figuur 1.

Dit nieuwe microscoop dat, door de hoge graad van perfectie waarmee het is vervaardigd, door de getransistoriseerde uitvoering en door de eenvoudige bediening hoge prestaties kan leveren, zal een grote verbetering in de dienstverlening betekenen. Daarnaast wordt door de uitgebreide en moderne hulpapparatuur waarover de afdeling beschikt, een grotere rationalisatie in de werkzaamheden bereikt.

De leiding van de nieuwe afdeling zal berusten bij de heer S.Henstra, die vanaf de oprichting van de Dienst werkzaam is geweest in de afdeling elektronenmicroscopie. Dit betekent dat ook de kwaliteit van de dienstverlening op hetzelfde hoge niveau zal worden gehandhaafd.

Met de reorganisatie wordt bovendien bereikt dat een nauwe samenwerking tussen de beide afdelingen elektronenmicroscopie zal ontstaan, hetgeen ten goede komt aan het onderzoek.

De nieuwe afdeling beschikt over een modern prepareerlaboratorium, over geconditioneerde ruimten voor het vervaardigen van ultradunne coupes, over zeer goed uitgeruste donkere kamers en over kamers voor opdrachtgevers/onderzoekers.

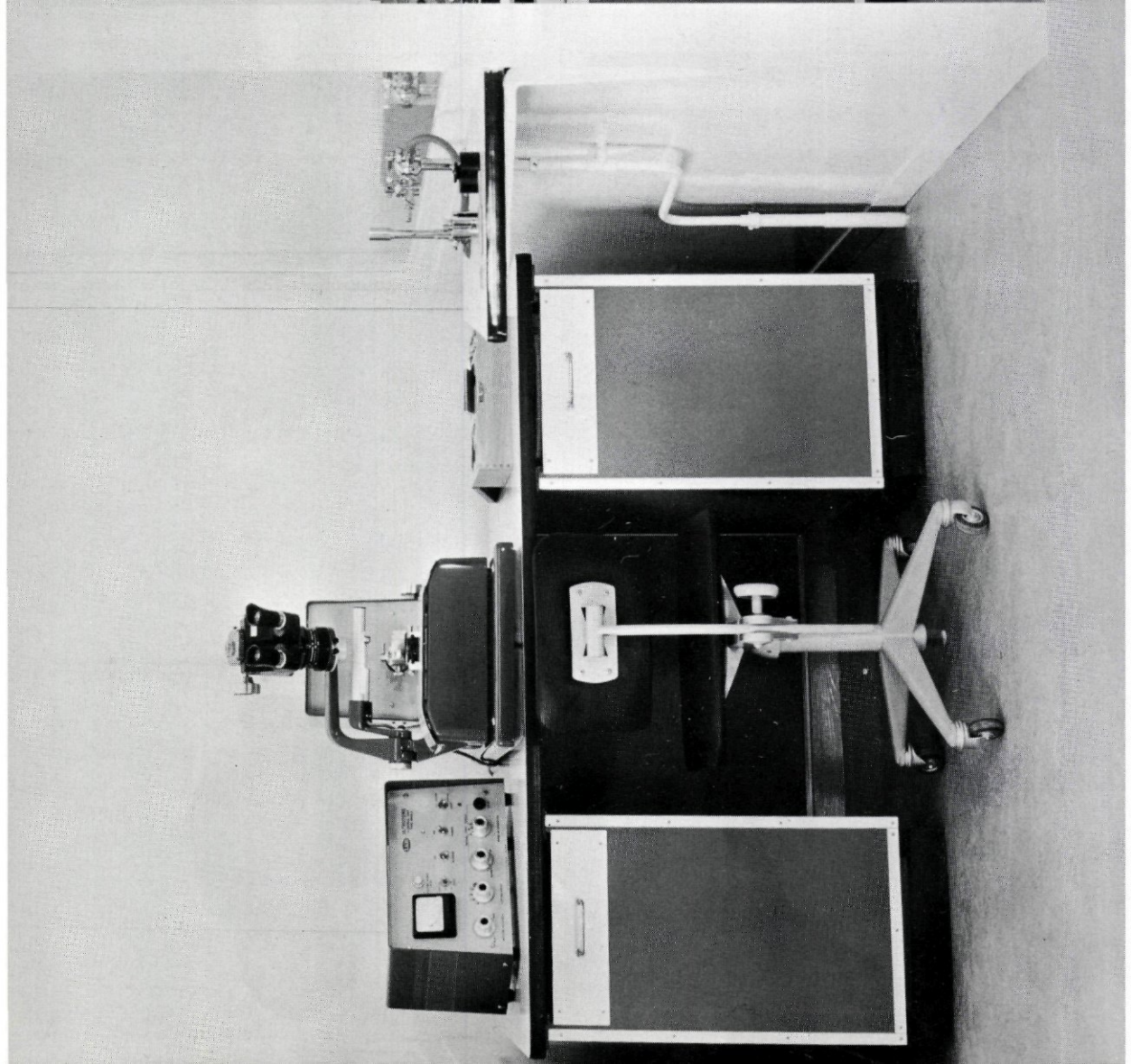
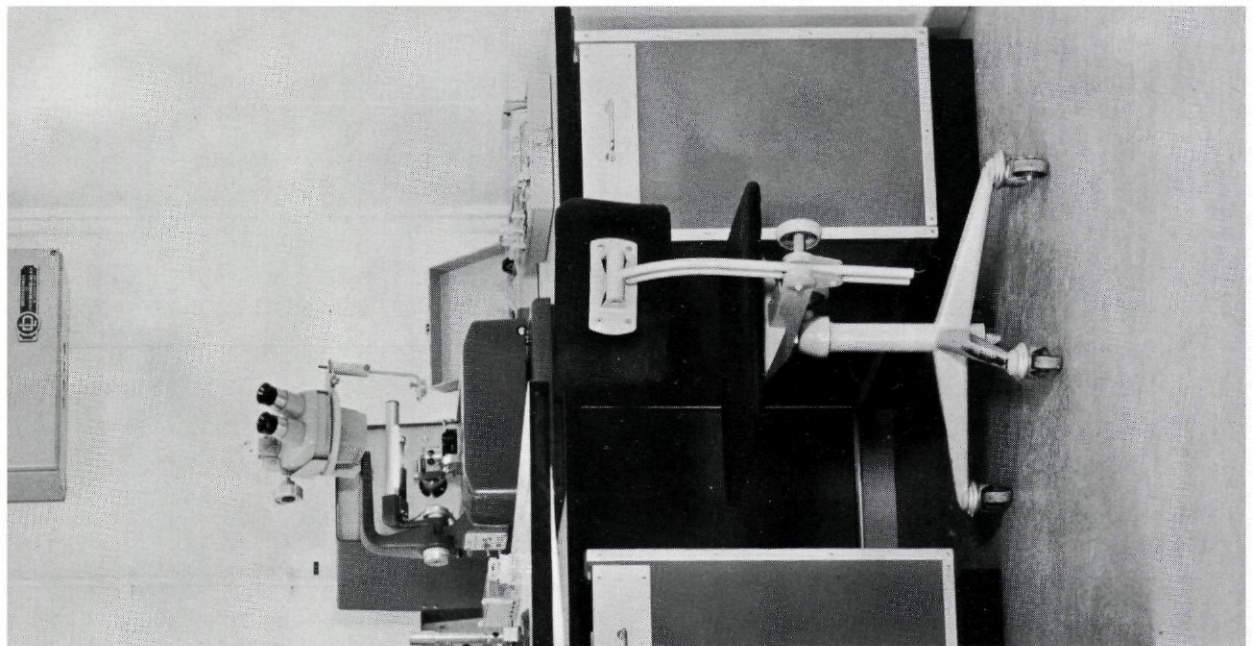
Voor al dit laatste is uitermate belangrijk, omdat bij sommige onderzoekingen de afstand tot het eigen laboratorium bezwaarlijk kan zijn. Door plaatsruimte te bieden aan gastonderzoekers, wordt nu ook de mogelijkheid geschapen, dat de opdrachtgever het onderzoek geheel zelf mee kan uitvoeren. Juist hier is de wisselwerking tussen onderzoeker en elektronenmicroscopist vaak bepalend voor het resultaat.

De figuren 3 en 4 geven een indruk van de nieuwe afdeling.

Tenslotte nog een enkel woord over de toekomstige ontwikkelingen. Na ver-

Fig.2a en b Twee opeenvolgende opnamen uit een doorfocusreeks van opgedampt platina, gemaakt tijdens de oplevering van het nieuwe Philips microscoop EM 300, ter bepaling van het oplossend vermogen.

Bij deze testopname bedraagt dit $4 \text{ \AA}$. Vergroting 1.500.000 x.



loop van enige tijd mag worden verwacht, dat opnieuw vele langlopende projecten door de Dienst zullen worden behandeld. Dan dreigt opnieuw de situatie die thans tot de reorganisatie heeft geleid. Als oplossing zou dan dezelfde weg bewandeld kunnen worden, dat wil zeggen: overdracht van een gedeelte van de kennis terwijl de TFDL haar dienstverlening voortzet voor de overblijvende Instellingen.

Cursussen

Een andere activiteit, die de nieuwe afdeling zich voorstelt te realiseren, is het geven van cursussen in prepareertechnieken en in het bijzonder in de ultramicrotomie. Steeds vaker blijkt dat de wijze waarop het te onderzoeken object wordt geprepareerd bepalend is voor de mate waarin de te onderzoeken structuren zichtbaar gemaakt kunnen worden.

In het algemeen geschieden deze werkzaamheden door de analisten, zodat vooral deze groep van medewerkers in aanmerking komt voor deelname.

Maar ook de onderzoeker die zich wil oriënteren over de toepassingsmogelijkheden, kan de cursussen bijwonen.

Voor het geven van de cursussen heeft de afdeling ondermeer de beschikking over drie ultramicrotomen. De cursussen zullen worden gegeven door de heer Henstra, die ondermeer een opleiding in de ultramicrotomie heeft gevolgd in Stockholm bij de LKB-fabrieken. Van de zijde van deze fabrieken is alle medewerking toegezegd bij het totstandkomen en het geven van de cursussen.

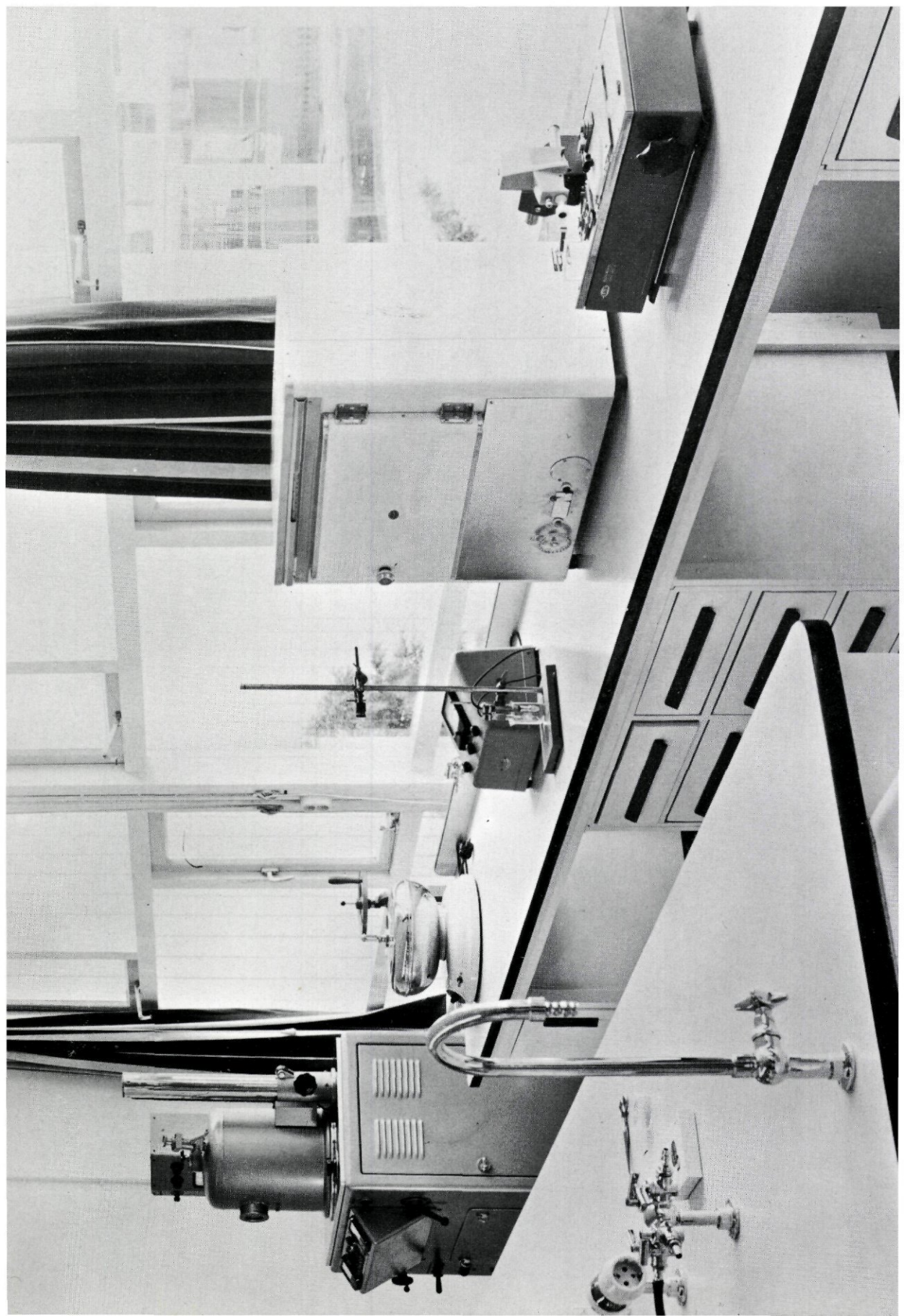
Tenslotte is het ook mogelijk dat analisten, die tijdens de analistenopleiding het bijvak elektronenmicroscopie kiezen, in de afdeling van de Dienst gedurende enige tijd aan de werkzaamheden deelnemen.

Met deze activiteiten zal een geheel nieuwe en, naar wordt verwacht, waardevolle, bijdrage tot het onderzoek worden geleverd

Doorberekening

Zoals bekend worden voor de dienstverlening kosten in rekening gebracht.

Fig.3 Voor het vervaardigen van ultradunne coupes beschikt de Dienst over drie ultramicrotomen, twee van het fabriikaat LKB, zie afbeelding, en één Porter-Blum. Hierdoor is het mogelijk dat naast de medewerkers van de TFDL, ook de opdrachtgevers zelf mede kunnen werken aan het vervaardigen van de ultradunne coupes, terwijl het instrumentarium tevens gebruikt wordt bij het geven van instructie.



De doorberekende kosten zijn echter veel lager dan de door de Dienst werkelijk gemaakte kosten. Wanneer daarbij in aanmerking wordt genomen, dat de inrichting van deze afdeling zeer kostbaar is, dan is het duidelijk dat slechts een klein gedeelte van de kosten met de huidige wijze van doorberekening terugvloeien (alleen de directe uitvoerende werkzaamheden worden in rekening gebracht, de voorstudies en het onderzoek niet). Hieruit volgt dat de kosten voor een onderzoek relatief laag zijn en geen belemmering behoeven te vormen voor het verstrekken van opdrachten. Voor deelname aan de cursus prepareermethoden en/of ultramicrotomie, zal een geringe bijdrage van de desbetreffende Instelling worden gevraagd ter bestrijding van de onkosten.

Conclusie

De boven beschreven reorganisatie heeft tot gevolg dat het elektronenmicroscopisch onderzoek sneller en doeltreffender kan worden uitgevoerd door een aanzienlijke uitbreiding van de onderzoekcapaciteit. Door de aanschaf van het meest moderne elektronenmicroscop met een zeer hoog oplosend vermogen, zullen nog fijnere details van submicroscopische structuren kunnen worden bestudeerd dan tot nu toe het geval was. De verwachting lijkt gewettigd dat hiermede het onderzoek ten zeerste gebaat is.

Fig.4 Een gedeelte van het prepareerlaboratorium; op de foto zijn ondermeer het schaduwapparaat, fabrikaat Balzers en de zogenaamde 'knifemaker', een apparaat om glasessen te vervaardigen, zichtbaar.

Elektronenmicroscopie

HISTORISCHE ONTWIKKELING

Drs. A.M.K. van Beek

In 1924 werd door Louis de Broglie de hypothese opgesteld dat met de beweging van elektronen en andere deeltjes een golfverschijnsel geassocieerd zou zijn. Voor de golflengte van deze materiegolven gaf hij de formule:

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

h = constante van Planck;

m en v zijn massa en snelheid van het beschouwde deeltje.

Voor een elektron dat bijvoorbeeld met een spanning van 60 KV wordt versneld, zou de golflengte 0,05 Å bedragen, dat wil zeggen 10^{-5} x de golflengte van het zichtbare groene licht.

De hypothese van De Broglie werd in 1927 ondermeer bevestigd door de experimenten van C.J. Davisson en L.H. Germer over de diffractie van elektronen. Theoretisch werden de problemen, die met het dualistisch karakter van golven en materie samenhangen door de ontwikkeling van de quantum- of golfmechanica, waaraan ondermeer de naam van E. Schrödinger is verbonden, tot oplossing gebracht.

Het was de grote verdienste van H. Busch om in 1926 de aandacht te vestigen op zijn studies over de lenswerking van magnetische en elektrostatische velden met axiale symmetrie op geladen deeltjes. Deze zeer belangrijke praktische consequentie van de theoriën van De Broglie en Schrödinger bleek de basis te vormen voor een geheel nieuwe ontwikkeling van de instrumentatie, namelijk die der elektronen optica. De studies door Busch verricht werden door hemzelf experimenteel bevestigd in 1927. Dit geschiedde eveneens door E. Ruska en M. Knoll in Duitsland in 1928 en 1931, die bovendien een zeer belangrijke bijdrage leverden door een grote verbetering in de magnetische lenswerking te realiseren. Deze twee onderzoekers ontwikkelden tevens in 1931 een instrument dat het eerste elektronenmicroscop genoemd kan worden. Inmiddels werden in 1931 door C.J. Davisson en C.J. Calbick soortgelijke resultaten gepubliceerd over de lenswerking van elektrostatische velden met axiale symmetrie. Vanaf deze jaren ontwikkelde de theorie van de elektronenoptica zich in zeer snel tempo en werden vele praktische resultaten gepubliceerd.

In 1934 toonden Ruska en Knoll aan, dat met een microscoop, uitgerust met magnetische lenzen, een vele malen groter oplossend vermogen zou kunnen

worden bereikt, dan met het lichtmicroscop mogelijk is. In hetzelfde jaar gelukte het E.Driest en H.O.Müller dit met het verbeterde prototype aan te tonen.

In de laboratoria van Siemens en Halske werkten E.Ruska en B.von Borries verder aan de verbetering van het elektronenmicroscop, hetgeen tot gevolg had dat in 1939 door deze firma het eerste commerciële elektronenmicroscop met een oplossend vermogen van 100 Å werd uitgebracht.

In Amerika werd in 1940 eenzelfde resultaat bereikt door de Radio Corporation of America (RCA), waar door J.Hillier, A.W.Vance en V.K.Zworykin een instrument met een oplossend vermogen van 24 Å ontwikkeld werd.

Waren de besproken elektronenmicroscopen allen uitgerust met magnetische lenzen, in 1939 werd door de Allgemeine Elektrizitäts Gesellschaft (AEG) het eerste elektronenmicroscop met elektrostatische lenzen, ontwikkeld door H.Mahl, uitgebracht.

In Nederland werd veel onderzoek verricht aan de ontwikkeling van het elektronenmicroscop door J.B. Le Poole aan de Technische Hogeschool te Delft en door A.C.van Dorsten bij Philips N.V.

Sedertdien zijn de verschillende typen en fabrikaten elkaar in snel tempo opgevolgd en thans kunnen er van een tiental fabrikaten een dertigtal typen commercieel worden verkregen.

Het meest worden de instrumenten met magnetische lenzen toegepast, aangezien de constructie en het storingvrij bedrijven van een instrument met elektrostatische lenzen, het oplossend vermogen beperkende, moeilijkheden blijkt op te leveren.

Hoewel de hiervoor beschreven theoriën geheel los van elkaar zijn opgesteld, vormen zij tezamen de basis voor de ontwikkeling van het elektronenmicroscop, een ontwikkeling die zich in ongeveer 15 jaar heeft voltrokken.

Nadien zijn vooral de bedrijfszekerheid en het oplossend vermogen verder verbeterd, terwijl men een veelheid van nieuwe technische ontwikkelingen bij de constructie heeft toegepast.

Tenslotte nog een enkel woord over het oplossend vermogen, waaronder wordt verstaan de kleinste afstand waaronder twee punten nog gescheiden kunnen worden waargenomen.

Volgens de theorie, ontwikkeld ondermeer door E.Abbe en Lord Rayleigh, kunnen twee punten (die altijd als vlekken worden afgebeeld) nog juist gescheiden worden waargenomen, indien de afstand tussen de punten met de maximale intensiteit, d , gelijk is aan:

$$d = \frac{0,612 \lambda}{n \sin \frac{1}{2} \alpha}$$

λ = golflengte van het gebruikte licht;

n = brekingsindex van de ruimte waarin het voorwerp is geplaatst als het beeld in lucht wordt gevormd;

α = apertuur aan de voorwerpszijde.

Met behulp van deze formule is te berekenen dat het theoretisch oplossend vermogen van het lichtmicroscop $1725 \text{ \AA}$ of 0.175μ , ($n = 1,5$, $\alpha = 90^\circ$, $\lambda = 4000 \text{ \AA}$), bedraagt.

Op soortgelijke wijze kan worden berekend, dat het theoretisch oplossend vermogen van het elektronenmicroscop ongeveer een factor 1000 x beter is en ongeveer $2 \text{ \AA}$ bedraagt.

Dat men met de constructie van de elektronenmicroscopen heel dicht tot deze limiet is genaderd, moge blijken uit het feit dat thans enkele microscopen te verkrijgen zijn met een gegarandeerd oplossend vermogen van $5 \text{ \AA}$.

Toepassingen

Met het beschikbaar komen van elektronenmicroscopen met een oplossend vermogen tot ongeveer $25 \text{ \AA}$ in het begin van de veertiger jaren, was het nog geenszins duidelijk welke toepassingen het gevolg van de ontdekking van deze nieuwe instrumenten zouden zijn.

Wel echter stond vast, dat de tot nu gevolgde methoden bij de toepassing van het lichtmicroscop, bezwaarlijk bij het elektronenmicroscop konden worden gebruikt. Immers, aangezien elektronen in lucht bij versnellingsspanningen van ongeveer 50 KV een dracht hebben van ongeveer 0,2 mm, was het noodzakelijk de gehele opstelling onder vacuüm te brengen met een druk van ongeveer 10^{-4} mm Hg of lager. Dit betekende, dat ook het te bestuderen object in het vacuüm moest worden gebracht, met het gevaar van uitdrogen, ontleden, e.d. Andere moeilijkheden waren ondermeer de sterke warmteontwikkeling in de preparaten bij het bombardement door elektronen en de technische problemen, verbonden aan het vervaardigen van coupes dunner dan $0,1 \mu$, vooral noodzakelijk voor de bestudering van biologische objecten. Boven geschetste problemen vormden, na het gereedkomen van het elektronenmicroscop, een geheel nieuw terrein van onderzoek, waarover in de laatste twintig jaren zeer vele publikaties zijn verschenen. Hoewel nog steeds nieuwe technieken worden gepubliceerd en nog niet alle problemen zijn opgelost, is het meest baanbrekende werk thans verricht en zal het zwaartepunt van het onderzoek zich in de toekomst vooral verschuiven naar de interpretatie van de zichtbaar gemaakte structuren. Toch zal men altijd de wijze van prepareren aan moeten passen aan het object, kleine veranderingen dienen aan te brengen in ontwikkelde methoden en veelvuldig moeten experimenteren om de gewenste resultaten te bereiken. Dit betekent, dat de prepareertechnieken nimmer volledige routinehandelingen kunnen zijn, doch veel meer door inventieve medewerkers, die inzicht hebben in de mogelijkheden van het elektronenmicroscop, experimenteel moet worden bepaald.

In deze korte beschouwing over de toepassingen, zullen slechts enkele prepareertechnieken kunnen worden genoemd. Voor meer uitgebreide informatie zij verwezen naar de opgegeven literatuur.

Het te onderzoeken preparaat wordt op een preparaatdrager, in een speciaal geconstrueerde houder in het microscoop gebracht. De preparaatdrager bestaat uit een dun koperen (of nikkel) roostertje met een diameter van bijvoorbeeld 3 mm. Het aantal gaten in het rooster varieert van 4 tot 20 stuks per strekkende millimeter. Over het rooster wordt een vlies aangebracht van formvar of collodion, waarop het preparaat komt te liggen. Sterkere vliezen die veel worden toegepast, zijn ondermeer vervaardigd van koolstof of siliciummonoxyde, die onder vacuüm worden opgedampt. De voorbehandeling van het preparaat is zeer verschillend en onafhankelijk van het te onderzoeken materiaal en van het desbetreffende onderzoek. Een eenvoudige methode is de indoopmethode. Hierbij wordt een stukje aangesneden weefsel in een op de preparaatdrager aangebrachte druppel gedestilleerd water gedoopt. De lichtste deeltjes, bijvoorbeeld virussen, diffunderen nu in het water. Na indoping blijven deze deeltjes op de drager achter en kunnen na schaduwen of kleuren in het elektronenmicroscoop worden bestudeerd.

Het zichtbaar worden van de structuur van een preparaat wordt veroorzaakt door selectieve verstrooiing van de elektronen in het preparaat. Verschillen in dichtheid worden derhalve waargenomen als verschillen in intensiteit, dat wil zeggen op de fotografische plaat als donkere en lichtere gedeelten. Vooral bij organische stoffen, zoals biologische preparaten, zijn de verschillen in dichtheid vaak zeer gering, waardoor ook het contrast klein is. Verschillende technieken werden daarom gedurende de laatste jaren ontwikkeld om de structuren duidelijker zichtbaar te maken. Een van de bekendste methoden daartoe is het 'schaduwen' van het preparaat. Hieronder verstaat men het opdampen van materiaal, bijvoorbeeld een metaal, onder een bepaalde hoek op het preparaat in vacuüm. De oneffenheden op het oppervlak van het preparaat ontvangen aan de ene zijde een metaallaagje, aan de andere zijde niet. Omdat de elektronen, die door het preparaat worden geschoten, in de met metaal bedekte gedeelten sterker verstrooid worden dan in de niet bedekte gedeelten, zal de zwarting op de fotografische plaat verschillend zijn. Wanneer de hoek, waaronder wordt geschaduwd, bekend is kan men hieruit bovendien de hoogte van de oneffenheden berekenen. Materialen die voor het schaduwen worden gebruikt zijn ondermeer: platina, palladium, chroom, wolfram en een combinatie van platina en koolstof. Van de te onderzoeken structuren hangt het af welk materiaal wordt gekozen.

Een andere veel toegepaste prepareermethode is de replica-methode, speciaal voor het bestuderen van oppervlakte-structuren van bijvoorbeeld metalen, dus van preparaten die ondoorzichtig zijn voor elektronen. Hierbij wordt een afdruk van het oppervlak gemaakt door er een druppel formvar- of collodionoplossing op te brengen en na droging het oorspronkelijke materiaal weg te etsen of op te lossen. Men krijgt op deze wijze dus een negatief van het oppervlak. Door middel van schaduwen kan men nu de oppervlakte-structuur zichtbaar maken. Bij de positieve replica-methode wordt van het, zoals boven beschreven gemaakte negatief, weer een positief gemaakt door nogmaals een afdruk van de replica te maken. Het voordeel van deze laatste methode is, dat het oppervlak van de replica hetzelfde is als het oorspronkelijk oppervlak, terwijl de negatieve replica veel dikker, dus minder kwetsbaar behoeft te zijn.

Bij het bestuderen van biologische weefsels wordt tegenwoordig zeer veel gebruik gemaakt van het snijden van ultradunne coupes. Het is hierbij noodzakelijk schijfjes materiaal te snijden met een dikte van 100 Å tot 500 Å. De technische problemen, die aan deze methode zijn verbonden, waren zo groot, dat pas in 1948 experimentele, reproduceerbare methoden in de literatuur werden gepubliceerd. Het duurde daarna nog ongeveer tien jaren, alvorens het eerste commercieel vervaardigde ultramicrotroom verkrijgbaar werd. De thans meest bekende instrumenten zijn het LKB-ultramicrotroom en het Porter-Blum-ultramicrotroom. Met deze techniek werd een veel groter gebied van onderzoek op biologisch gebied mogelijk.

De bij deze methode toegepaste werkwijze kan als volgt kort worden aangegeven.

Een stukje weefsel ter grootte van ongeveer 1 mm³ wordt gefixeerd met behulp van bijvoorbeeld osmiumtetroxyde, kaliumpermanganaat e.d. waarna, na wassen en ontwateren, het weefsel in plastic wordt ingebed. Veel toegepaste inbedmaterialen zijn ondermeer : methacrylaat, vestopal, araldit, epon en maraglas. De toepassing is echter sterk afhankelijk van het te bestuderen weefsel, terwijl het succes sterk persoonlijk blijkt te zijn. Ook op dit gebied is de ontwikkeling nog in volle gang en jaarlijks worden nieuwe methoden gepubliceerd.

Na polymerisatie van het inbedmateriaal, wordt het zo verkregen staafje in het ultramicrotroom gebracht en gesneden. Voor het snijden worden meestal glasmessen gebruikt, die op een speciale manier worden gebroken, waarbij de snijkant wordt gevormd door twee breekvlakken.

In de laatste jaren zijn echter ook diamantmessen beschikbaar gekomen, die bij toepassing van bepaalde inbedmaterialen aanzienlijk betere resultaten geven. De verkregen coupes worden daarna op de objectdrager gebracht en in

het elektronenmicroscop bestudeerd. Opgemerkt zij dat vaak honderden coupes voor één enkele succesvolle opname nodig zijn.

Om het contrast te vergroten, wat nu niet via de schaduwtechniek mogelijk is, immers het oppervlak is geheel glad, zijn zogenaamde kleuringstechnieken ontwikkeld. Hierbij worden stoffen met een grote dichtheid, dus met een groot elektronen verstrooiend vermogen ten opzichte van het te onderzoeken materiaal, in het preparaat gebracht. Voorbeelden van dergelijke kleuringsmiddelen zijn ondermeer: uranylacetaat, loodcitraat, kaliumpermanganaat e.d. De toepassing van deze methoden is nogal gecompliceerd en vereist zeer veel ervaring. Bovendien is ook hier vaak lang experimenteren noodzakelijk, alvorens het beoogde resultaat wordt bereikt.

Het bovenstaande kan slechts een indruk geven van de mogelijkheden en van de moeilijkheden bij het bestuderen van de preparaten met elektronenmicroscop. Vele, van het ontelbaar aantal in de literatuur beschreven prepareermethoden, zijn in de afdeling elektronenmicroscopie van de Dienst beproefd en toegepast. Juist op dit terrein hopen wij in de komende jaren verdere voortgang te bereiken.

Algemene literatuur

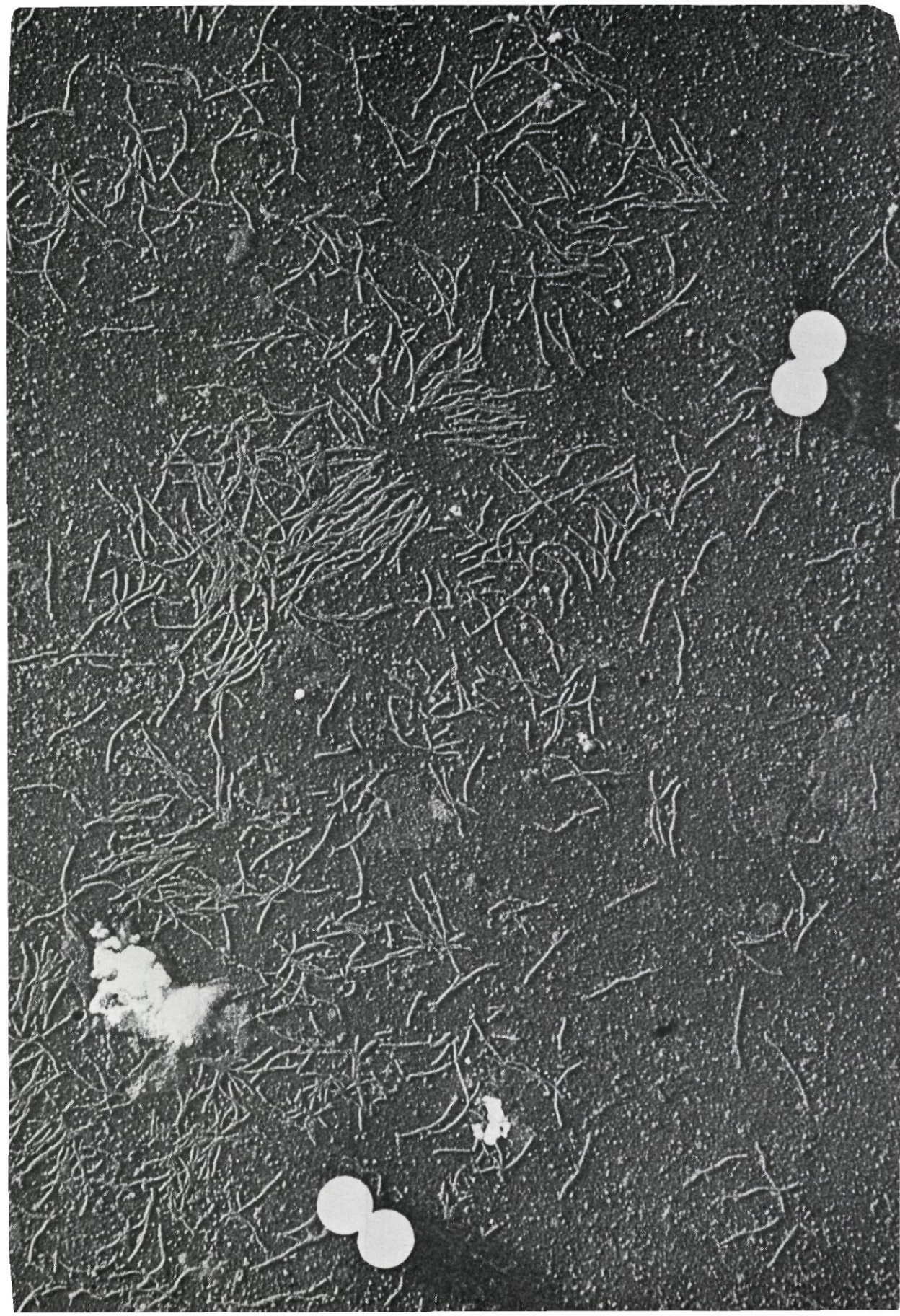
1. C.E.Hall 'Introduction to Electron Microscopy'
McGraw-Hill, New York, 1966.
2. M.E.Haine en V.E.Cosslett 'The Electron Microscope'
Interscience Publishers Inc., New York, 1961.
3. D.Kay e.a. 'Techniques for Electron Microscopy'
Blackwell Scientific Ltd., Oxford, 1965.
4. D.C.Pease 'Histological Techniques for Electron Microscopy'
Academic Press Inc., New York, 1964
5. C.G.Nestler 'Einführung in die Elektronenmetallographie'
VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie,
Leipzig, 1961.
6. A.Ruthmann 'Methoden der Zellforschung'
Franckhische Verlagshandlung, Stuttgart, 1966.
7. J.A.G.Rhodin 'An Atlas of Ultrastructure'
W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1963.
8. Don W.Fawcett 'An Atlas of Fine Structure, The Cell'
W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1966.

Werkzaamheden 1957 - 1967

Samengesteld door

mevrouw Drs.C.van der Scheer en de heer S.Henstra

De achter de namen vermelde cijfers verwijzen naar de publikaties over het betreffende onderwerp.



Philips Elektronenmicroscop EM 100

Figuur 5, vergroting 32.000 x

Het witte-klaervermozaiekvirus is een virus, waar behalve verschillende klaversoorten ook verschillende erwte- en bonerassen vatbaar voor zijn. Het materiaal dat gebruikt is voor deze foto, is afkomstig van erwten die met dit virus geïnfecteerd waren. Daartoe werd 50 mg plantemateriaal fijn gewreven in een mortier met 2,5 ml gedestilleerd water. Dit sap werd 1 : 100 verdund en met een pyrex verstuiver verneveld op de preparaatdragers. Vervolgens werden de preparaten geschaduwd met palladium. De deeltjes op de foto hebben een lengte van ca. 475 mμ.

¹ Onderzoek van Dr.Ir. L.Bos ⁶⁾ van het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek te Wageningen.



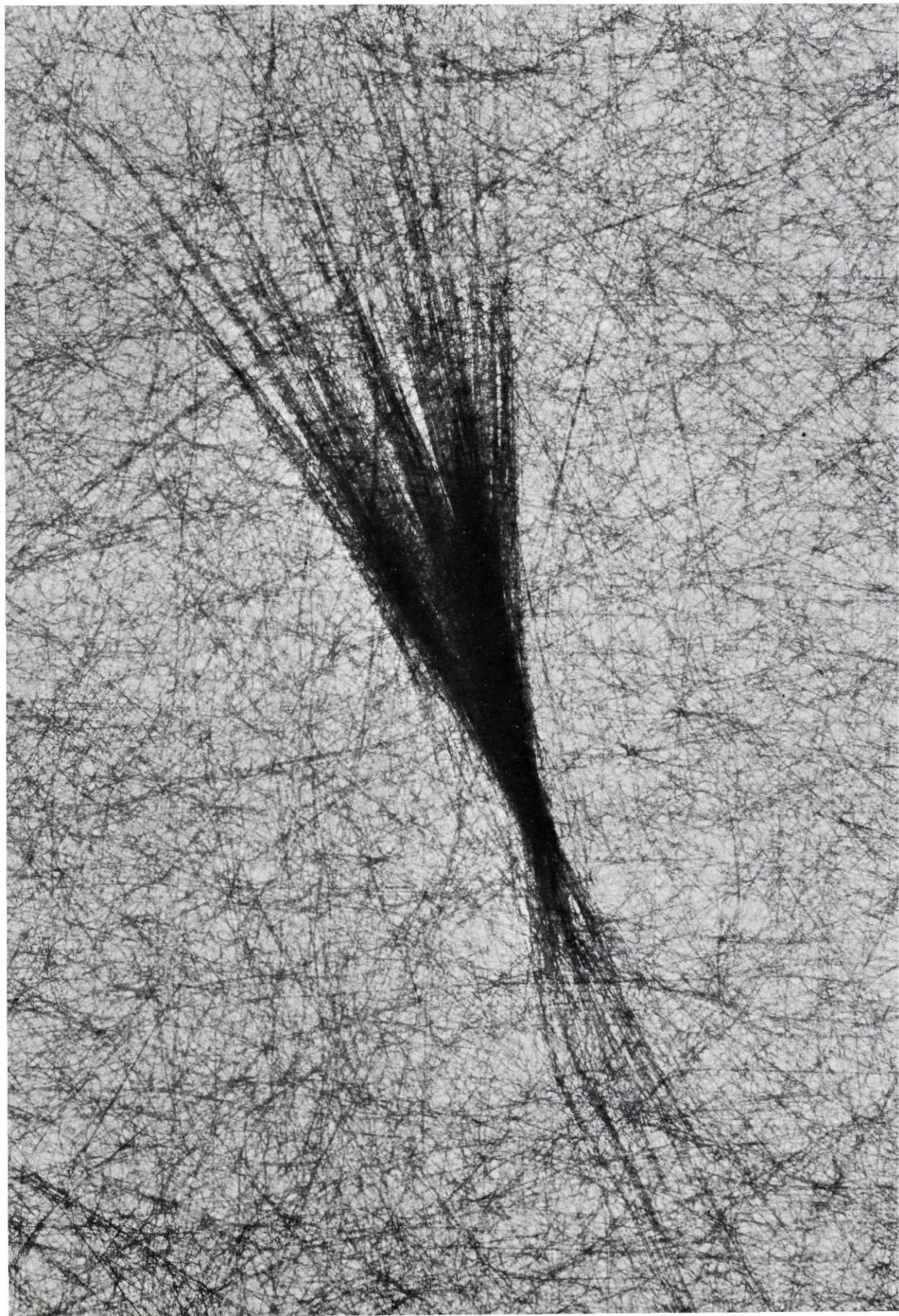
Philips elektronenmicroscop EM 100

Figuur 6, vergroting 30.000 x

De schimmel *Phytophthora infestans* is de verwekker van de aardappelziekte. Het doel van dit onderzoek was na te gaan hoe de zweepharen (flagellen) van de zoösporen van deze schimmel zich ontwikkelen en wat de uiteindelijke structuur hiervan is. Hierbij werd de volgende methode toegepast:

De zoösporen werden verkregen door de vruchtlichaampjes (sporangia) gedurende 3 uur bij 10 °C te plaatsen in een petrischaal gevuld met gedestilleerd water. De zoösporen zullen nu het vruchtlichaam verlaten en er ontstaat een suspensie van zoösporen. Om een bepaald ontwikkelingsstadium vast te leggen, worden de zoösporen na een bepaalde tijd gefixeerd met osmiumtetroxide. Voor het preparaat wordt nu een druppel van deze suspensie op een preparaatdrager gebracht en na indroging geschaduwd met palladium. Op de foto zien we de korte zweepdraad van een zoöspore die reeds in een gedisintegreerd stadium verkeert. De afzonderlijke draden, waaruit deze zweepdraad is opgebouwd zijn duidelijk te onderscheiden. Dwars hierop geplaatst bevinden zich weer fijne haren met een dun uiteinde.

¹ Onderzoek van Dr.Ir. A.P.Kole ⁸⁾ van de Afdeling Fytopathologie van de Landbouwhogeschool.



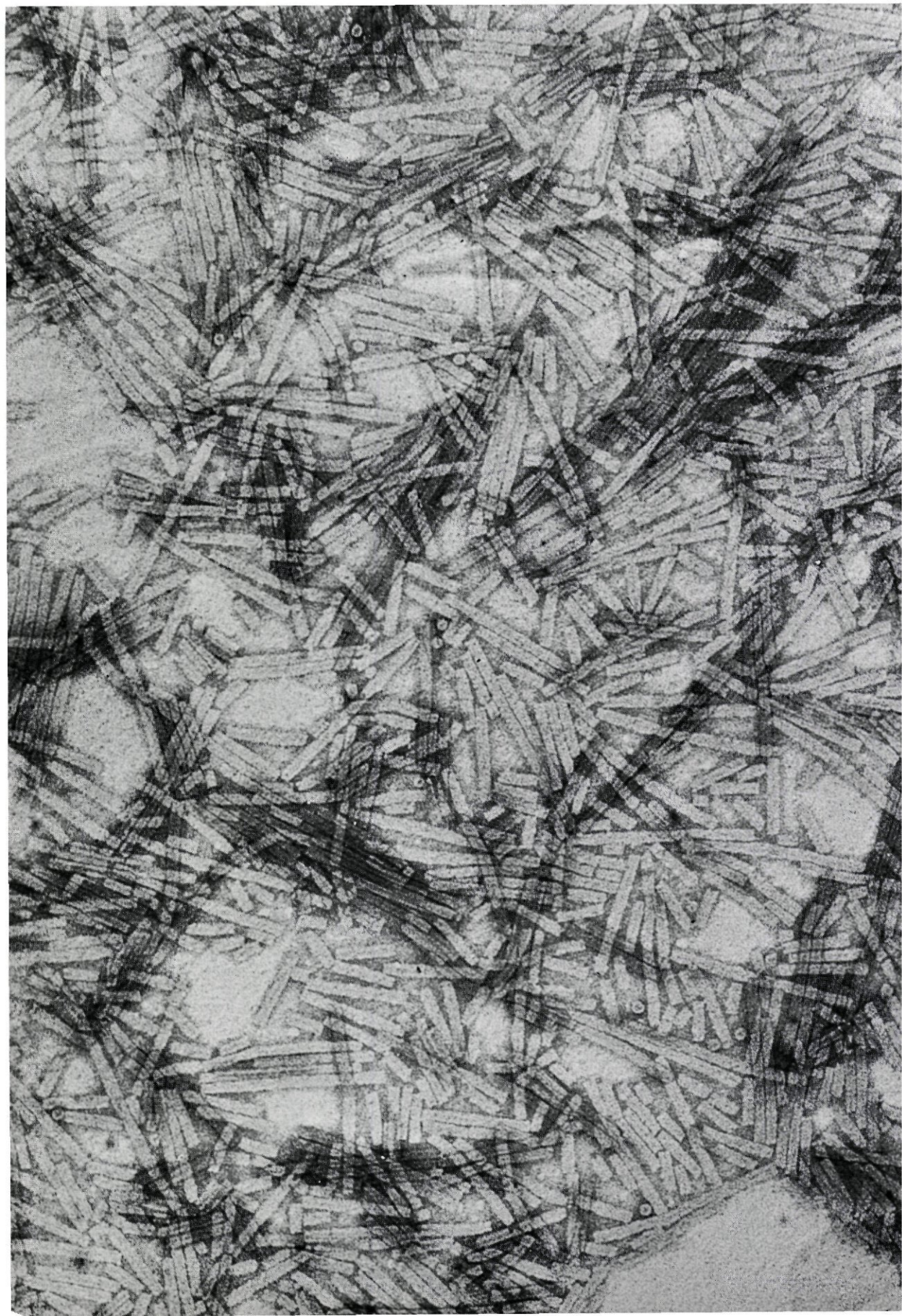
OPNAME VAN VANADIUM PENTOXYDE ¹ (1959)

Philips elektronenmicroscop EM 100

Figuur 7, vergroting 25.000 x

Op de foto zien we deeltjes van een kolliïdale dispersie in water ('hydrosol') van Vanadium pentoxyde, V_2O_5 . De naaldvormige deeltjes hebben een diameter $< 0,01 \mu$ en een lengte $> 10 \mu$.

¹ Onderzoek van de Afdeling Fysische- en Kolloïdchemie van de Landbouwhogeschool.



Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 8, vergroting 130.000 x

Het in 1960 nieuw aangeschafte Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I met een oplossend vermogen van 10 Å gaf nieuwe mogelijkheden voor het onderzoek. Zo kon o.a. de negatieve kleuringsmethode met kaliumfosforwolframaat (PTA) toegepast worden. Deze methode welke de mogelijkheid geeft om bij virussen iets van de inwendige structuur zichtbaar te maken, vereist een hoog oplossend vermogen hetgeen met de Philips EM 100 (oplossend vermogen 25 Å) niet bereikt kon worden.

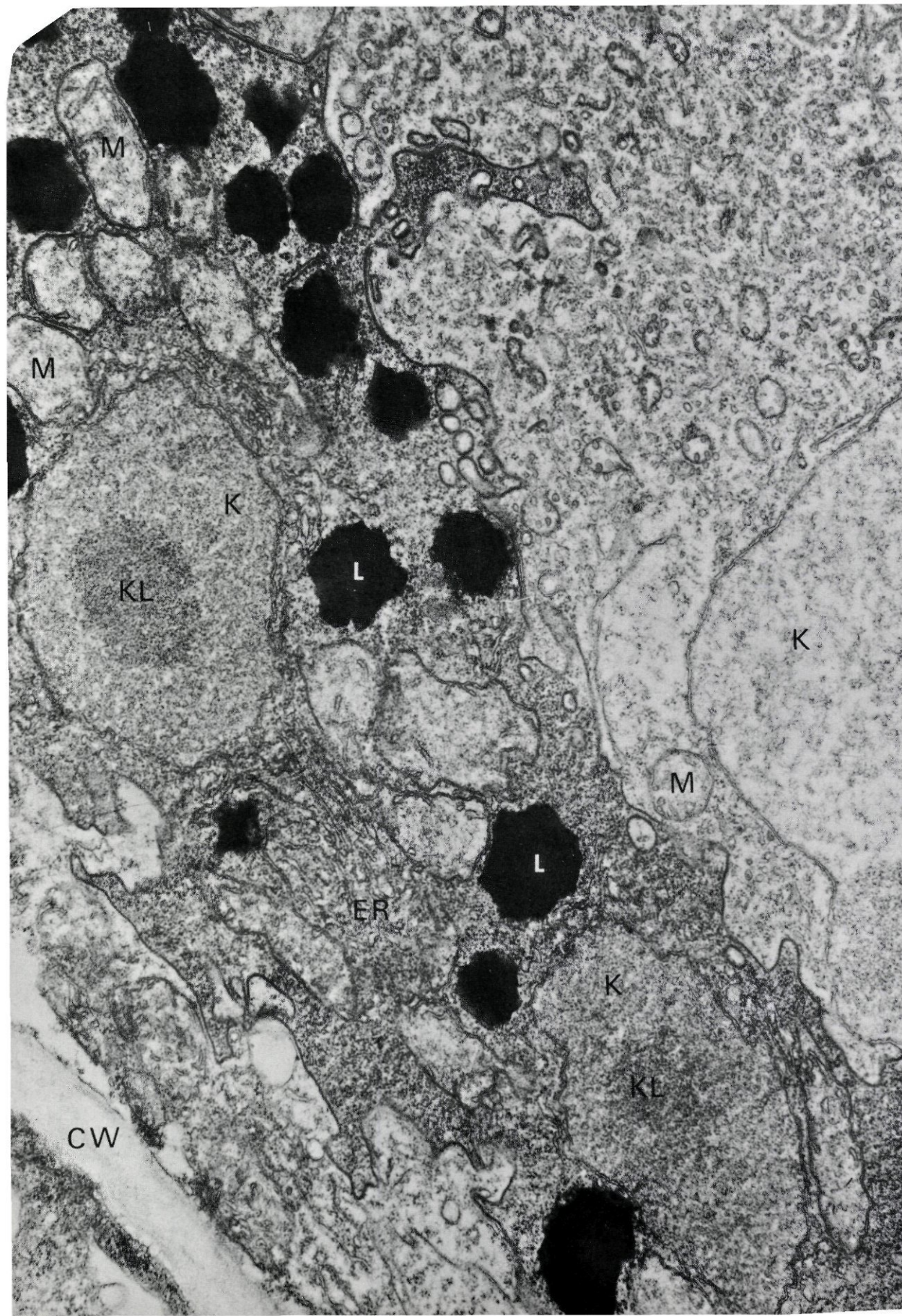
Nevenstaande foto is het resultaat van de eerste pogingen welke in deze richting ondernomen werden. Op een preparaatdrager voorzien van een koolstofvlies werd een suspensie verstoven van tabaksmozaiekvirus, die vermengd was met 25% PTA, pH 7.0.

Hoewel deze eerste foto nog niet aan hoge eisen voldoet, zijn er toch enkele staafvormige deeltjes waarin een donkere kern zichtbaar is.

Deze kern is een holte welke door PTA opgevuld is.

In de schijfjes welke rechtop staan en als rondjes zichtbaar zijn, is dit beter te zien.

¹ Onderzoek van Dr.A.van Kammen van de Afdeling Virologie van de landbouwhogeschool.



Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

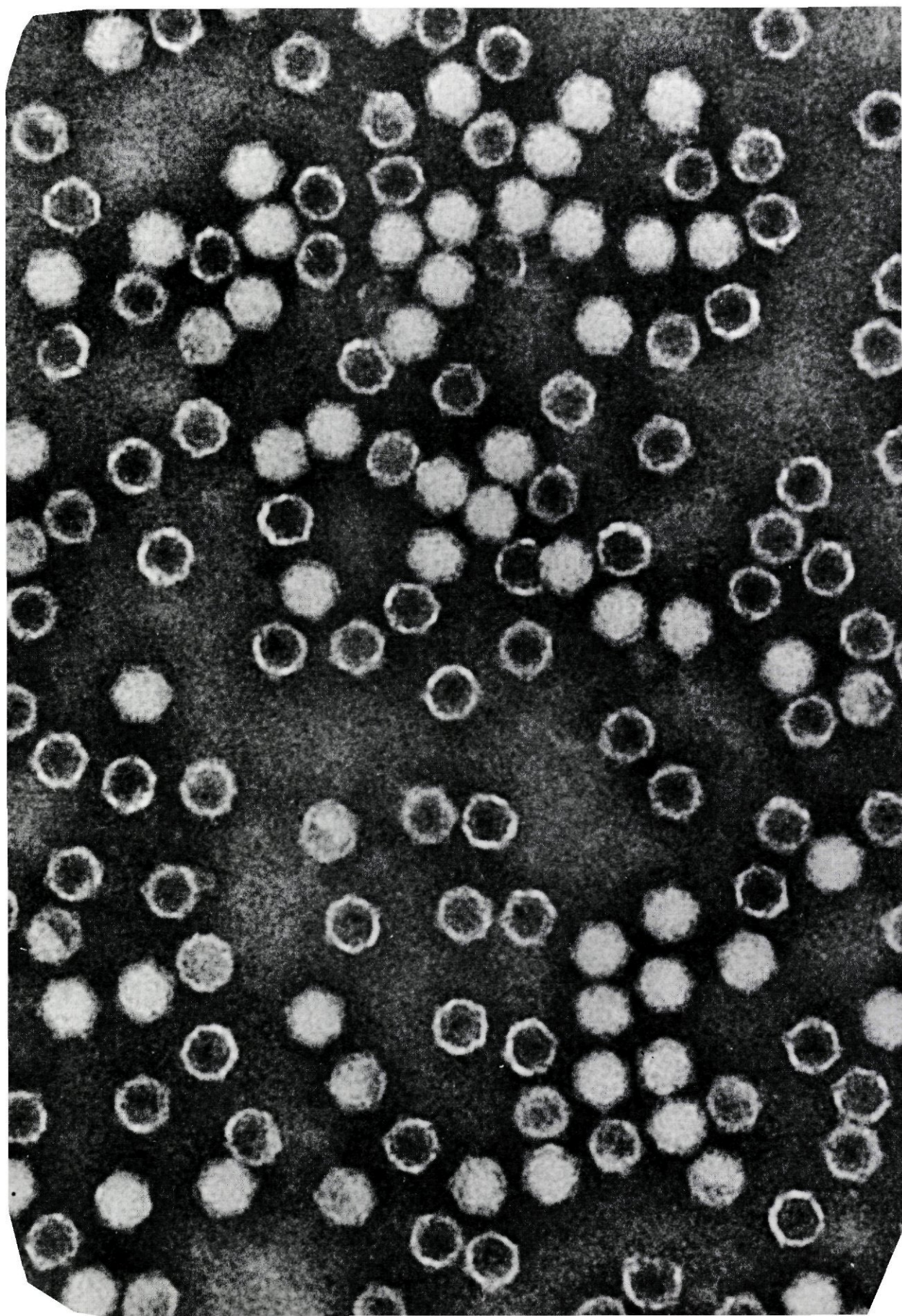
Figuur 9, vergroting 28.000 x

De knolvoetschimmel is een schimmelziekte, waardoor veel koolgewassen aangetast kunnen worden. Deze ziekte openbaart zich door het optreden van onregelmatige opzwellingen aan de wortels, overgaande in rotting.

Op de foto zien we een gedeelte van een wortelcel van Chinese kool welke door knolvoet is aangetast. Het lichte celgedeelte is de waardcel, het donkere gedeelte het plasmodium. In de waardcel kunnen we een gedeelte van de kern (K) onderscheiden, de celwand (CW) en enkele mitochondriën (M). In het plasmodium, dat vele kernen bevat, kunnen we 2 kernen (K) onderscheiden met daarin een kernlichaampje (KL), lipiden (L), mitochondriën (M) en een gedeelte van het endoplasmatisch reticulum (ER).

Het weefsel werd gefixeerd in 1% osmiumtetroxyde en ontwaterd in een alcoholreeks. Daarna werd ingebed in methacrylaat. De coupes werden met een glasmes gesneden op het Porter-Blum ultramicrotoom en nagekleurd met kaliumpermanganaat.

¹ Onderzoek van Dr.A.P.Kole en Ir.T.S.Ie voor de Afdeling Fytopathologie van de Landbouwhogeschool.



OPNAME VAN 'COWPEA MOSAIC VIRUS' ¹ (1962)

Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 10, vergroting 400.000 x

Het 'Cowpea mosaic virus' is een virus, waardoor vele vlinderbloemige gewassen aangetast kunnen worden. Cowpea, de plant waarbij dit virus voor het eerst ontdekt werd, is een erwtesoort, die in de tropen en de subtropen veel verbouwd wordt en beschouwd wordt als een van de oudste plantaardige voedingsbronnen voor de mens. De foto toont een opname van dit virus, waarbij uitgegaan is van een gezuiverde suspensie.

Het preparaat is negatief gekleurd met fosforwolframaanzuur (PTA) met een pH 7,0.

Op de foto zijn twee soorten deeltjes te onderscheiden, de zogenaamde 'lege' en 'volle' deeltjes. Bovendien blijkt dat niet alle deeltjes dezelfde vorm hebben. Sommige deeltjes worden waargenomen als een zeshoek, terwijl andere deeltjes er uitzien als een twaalfhoek. Deze verschillen berusten op verschillende orientaties van de deeltjes in het preparaat. In werkelijkheid hebben deze deeltjes een polyedervorm. Met welk type polyeder we te maken hebben en uit hoeveel 'subunits' dit bestaat, vormde het doel van dit onderzoek.

¹ Onderzoek van Dr.H.O.Agrawal ¹⁹⁾ gastmedewerker van de Afdeling Virologie van de Landbouwhogeschool.



OPNAME VAN DE VERANKERING VAN DE VEZELS VAN HET BUITENSTE SCHAALVLIES IN
DE SCHAAL VAN EENKIPPEEI ¹ (1962)

Siemens elektronenmicroscoop Elmiskop I

Figuur 11, vergroting 40.000 x

De schaalvliezen, die om het eiwit aan de binnenkant van de schaal zijn gevormd, bestaan uit vezels. Deze vezels, de donkere partijen, zijn in de verkalkte schaal verankerd. In nevenstaande opname, die de ankerplaats in een radicale doorsnede van de ontkalkte schaal weergeeft, zijn de grenzen van de verdwenen calcietskristallen nog duidelijk zichtbaar.

De ontkalking van het object geschiedde in een oplossing met 5% ethyleen-diaminetetraëcetaat (EDTA), voor de ontkalking en 5% formaline voor de fixatie. Daarna werd nagefixeerd met osmiumtetroxyde. Na ontwatering werd ingebed in Epon 812.

De coupes zijn gesneden met een glasmaas op het Porter-Blum ultramicrotoom en nagekleurd met loodcitraat en uranylacetaat.

¹ Onderzoek van Dr.P.C.M.Simons ¹⁴⁾ van het Instituut voor Pluimveeteelt 'Het Spelderholt' en Dr.G.Wiertz van de Afdeling Fysiologie der Dieren van de Landbouwhogeschool.



Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 12, vergroting 44.000 x

Figuur 13, vergroting 40.000 x

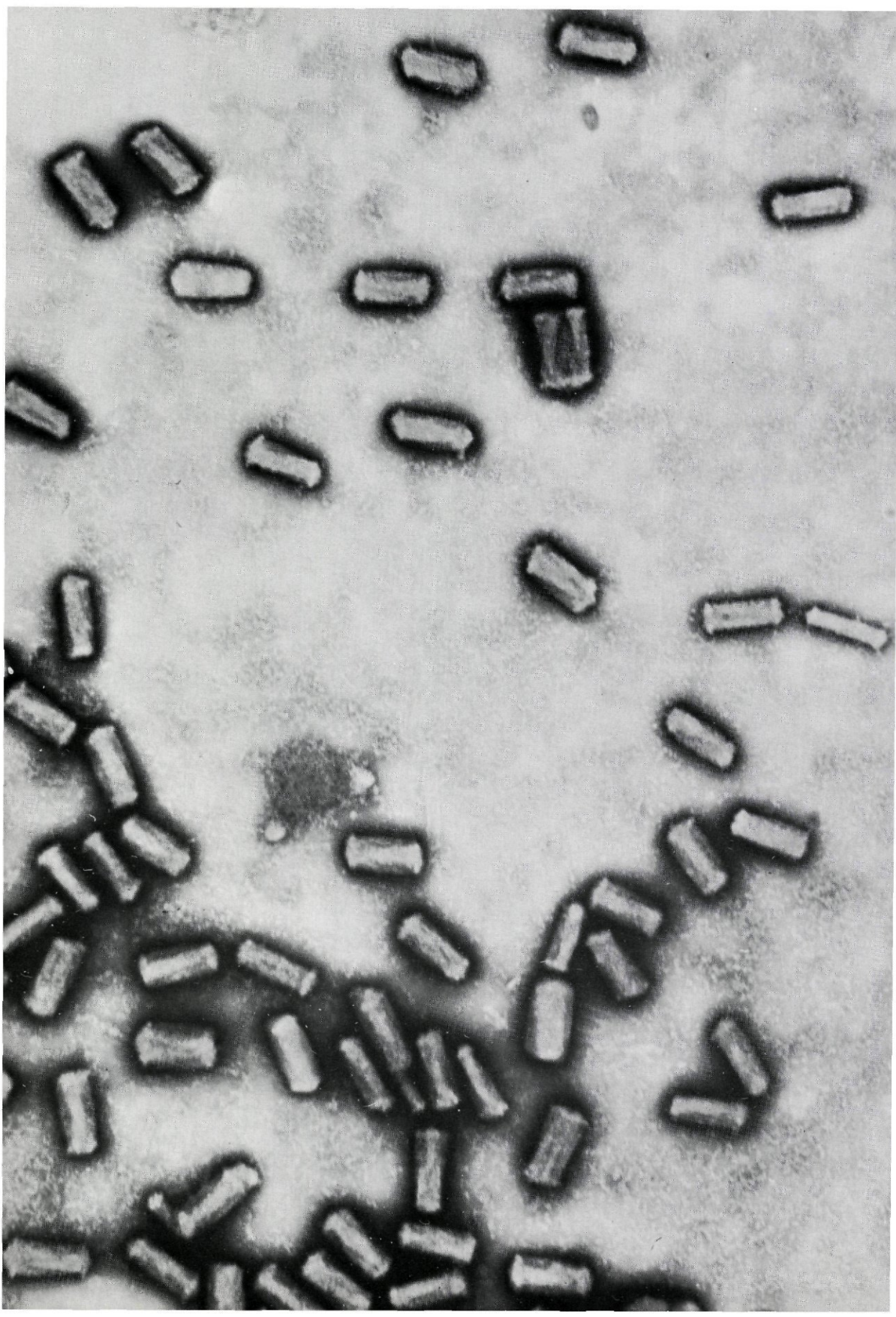
Figuur 14, vergroting 400.000 x

Het kernpolyedervirus van *Malacosoma neustria* (ringelrups) kan bij deze rupsen een ziekte teweegbrengen, waardoor zij sterven. Voordien heeft zich in het lichaam van de rups echter reeds een zeer grote hoeveelheid van dit virus gevormd. Om bovengenoemde redenen is dit virus van groot belang voor de harmonische bestrijding van rupsenplagen.

De virusstaafjes komen voor in bundels die omgeven zijn door een lipide membraan. Deze bundels van virusstaafjes liggen ingebed in een matrix, bestaande uit eiwit, dat weer door een membraan wordt omsloten. Het geheel heeft de vorm van een polyeder, vandaar de naam polyedervirus. Het voorvoegsel 'kern' is afkomstig van het feit, dat dit virus zich vermeerderd in de kernen van vetcellen, bloedcellen, epidermis en tracheale matrix cellen. Door behandeling met 0,1 N natriumcarbonaat wordt het polyeder-eiwit opgelost. In figuur 12 is dit zeer fraai waar te nemen. We zien hier een polyeder, waarvan de polyedermembraan is opengebarsten en een gedeelte van de inhoud er uitvloeit. De virusbundels zijn echter nog geheel intact.

Het preparaat is geschaduwd met palladium.

¹ Onderzoek van Ir.M.B.Ponsen ^{20 25 26)} van de Afdeling Virologie van de Landbouwhogeschool.

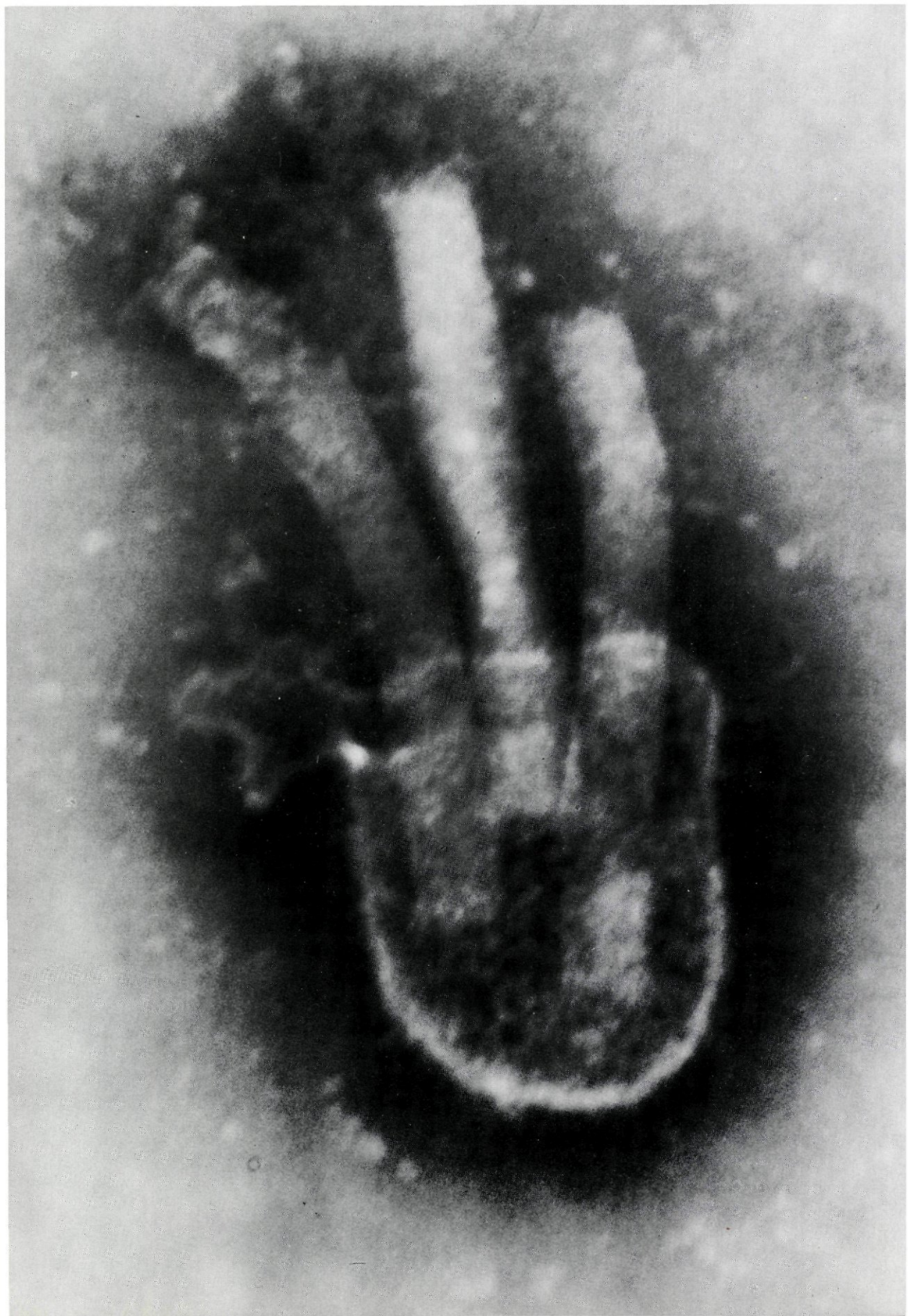


Opname van kernpolyedervirus afkomstig van *Malacosoma neustria*

Figuur 13, vergroting 40.000 x

Uit figuur 13 blijkt dat de virusbundels van het kernpolyedervirus nog allen intact zijn. De membranen, welke de bundels omgeven, zijn echter zo transparant, dat de orientatie van de virusstaafjes in deze bundels meestal goed zichtbaar is.

Uit dit feit en uit de afmetingen van de bundels kan worden geconcludeerd, dat niet iedere bundel een gelijk aantal staafjes bevat.



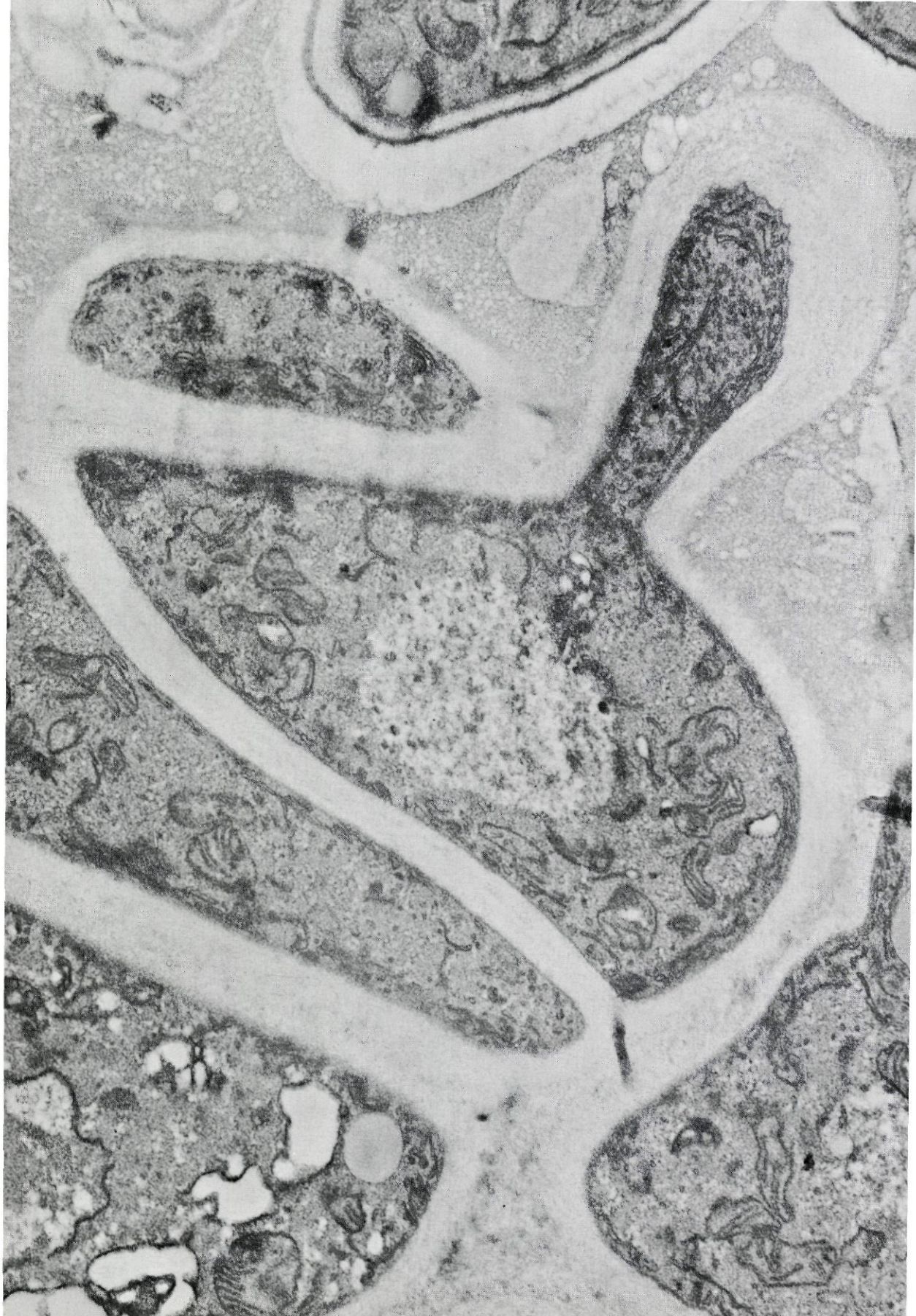
Figuur 14, vergroting 400.000 x

Wanneer kernpolyeders langdurig behandeld worden met 0,1 natriumcarbonaat zullen ook de membranen, welke de virusbundels omgeven, aangetast worden en de afzonderlijke virusstaafjes vrij komen.

Figuur 14 toont een opname van het zo behandelde kernpolyedervirus.

Het preparaat is daarna gewassen met gedestilleerd water waaraan fosforwolfraamzuur met een pH 5,5 is toegevoegd.

Aangenomen wordt, dat deze virusbundel oorspronkelijk drie virusstaafjes bevatte. Bij één van de staafjes is het membraan, dat elk staafje afzonderlijk omgeeft, aangetast.

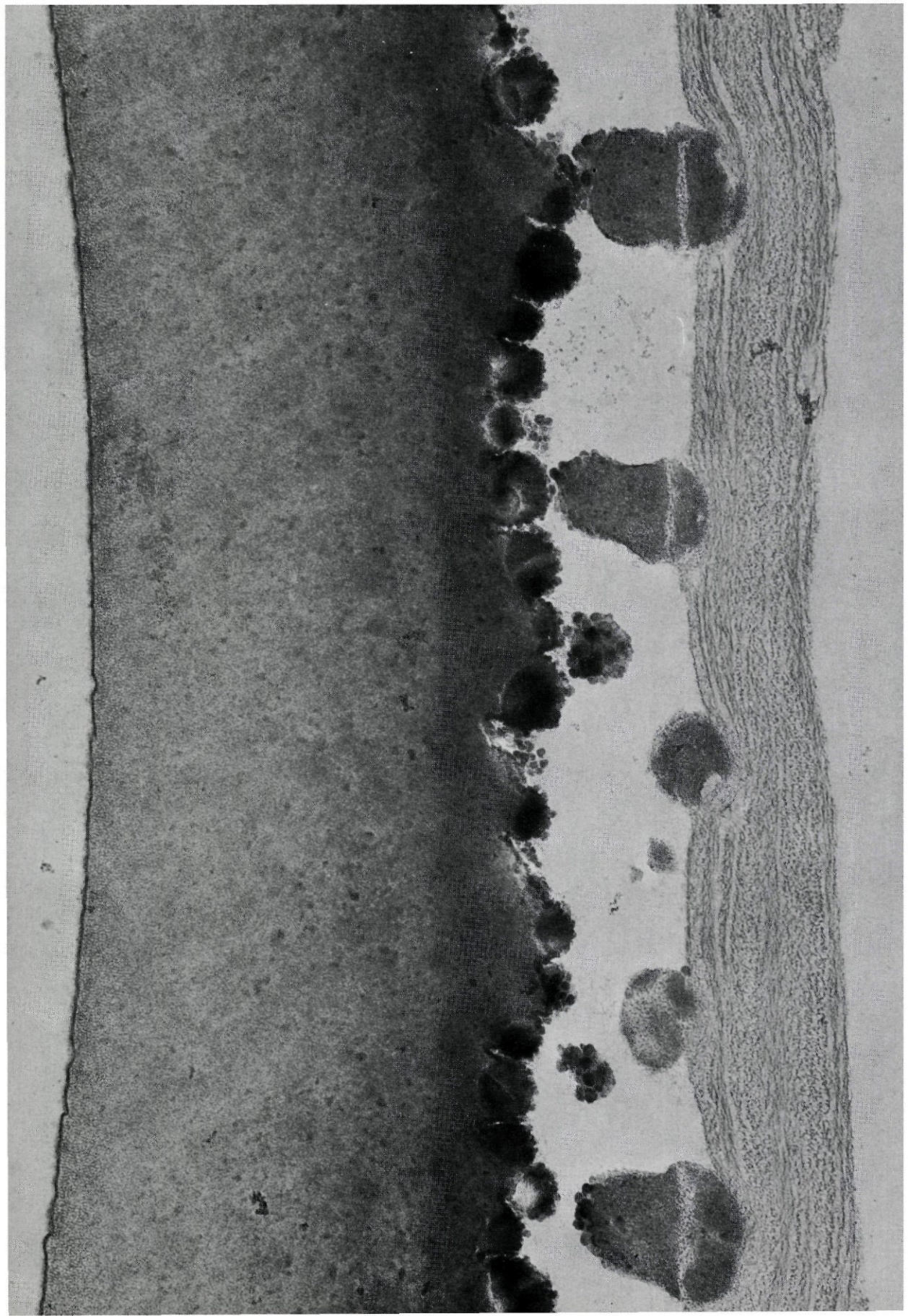


Philips elektronenmicroscop EM 100

Figuur 15, vergroting 12.000 x

Het doel van dit onderzoek was betere criteria te vinden voor het onderscheid tussen twee geslachten uit het schimmelrijk, daar de tot nog toe gebruikte kenmerken niet bleken te voldoen. Hiervoor werden de sporen van verschillende schimmels elektronenmicroscopisch onderzocht. Deze sporen bevinden zich in de vruchtlichaampjes de zogenaamde pycniden. Het materiaal voor dit onderzoek werd ontleend aan gedroogde bladeren van *Campanula glomerata* of een isolatie die gekweekt is op lupinewortels. De pycniden werden daartoe voorgefixeerd gedurende 3 tot 5 minuten in een ongebufferde waterige oplossing van 2% kaliumpermanganaat, vervolgens 4 uur nagefixeerd in 1% osmiumtetroxyde in veronal acetaatbuffer. Na gewassen te zijn in buffer-oplossing werd ontwaterd in alcohol en ingebed in methacrylaat. De coupes werden gesneden met een diamantmes op een LKB ultramicrotoom.

¹ Onderzoek verricht in samenwerking met Ir. J. G. Brewer ²⁷⁾ van de Afdeling Fytopathologie van de Landbouwhogeschool.



Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 16, vergroting 36.000 x

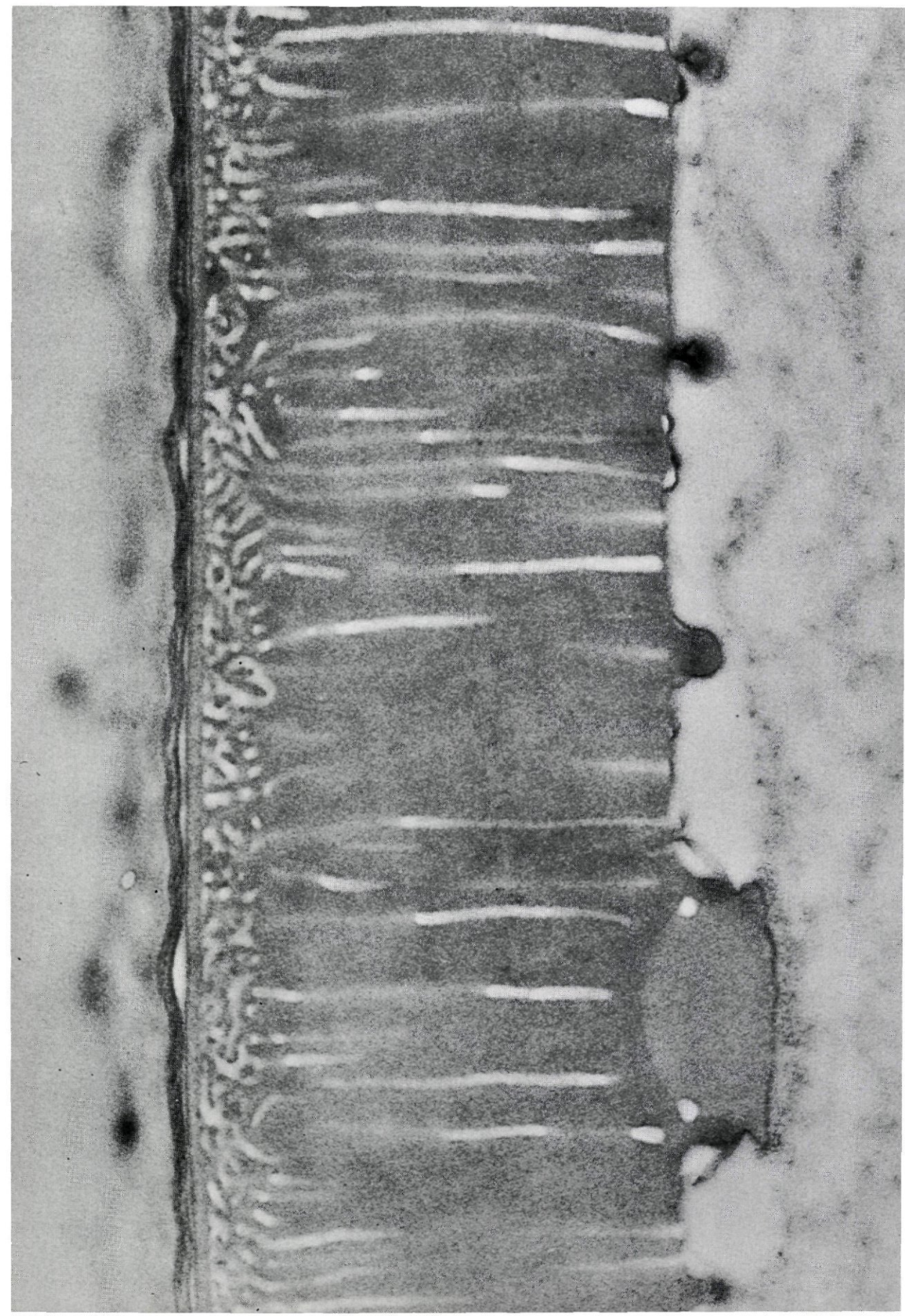
Figuur 17, vergroting 45.000 x

Figuur 18, vergroting 22.000 x

Van drie verschillende soorten wantsen, elk behorend tot een andere familie, zijn van de eischalen coupes gemaakt en met het elektronenmicroscop bestudeerd. De coupes zijn afkomstig van het niet gespecialiseerde midden-deel van het ei, waarin bijzondere structuren voor het doorlaten van sperma, atmosferische lucht, water en de gepreformeerde ontsluitingsnaden niet zichtbaar zijn. Desondanks vertonen de figuren markante verschillen in de opbouw van de eischaal (chorion).

In nevenstaande figuur is de dwarsdoorsnede afgebeeld van de eischaal van *Hebrus elimatus*, (familie Hebridae). De eieren worden afgezet in een vochtige omgeving, bijvoorbeeld een oever; het embryo kan zich normaal ontwikkelen wanneer de eieren voortdurend onder water worden gehouden. De eischaal van deze soort is geheel massief, terwijl het chorion aan de buitenkant uitsteeksels vertoont, waarover een laag van een gelei-achtige substantie is gespannen. Deze laatste wordt evenals het chorion afgescheiden in de ovariolen. De coupe is gemaakt van een ovarium-ei. Het preparaat is gekleurd met kaliumpermanganaat.

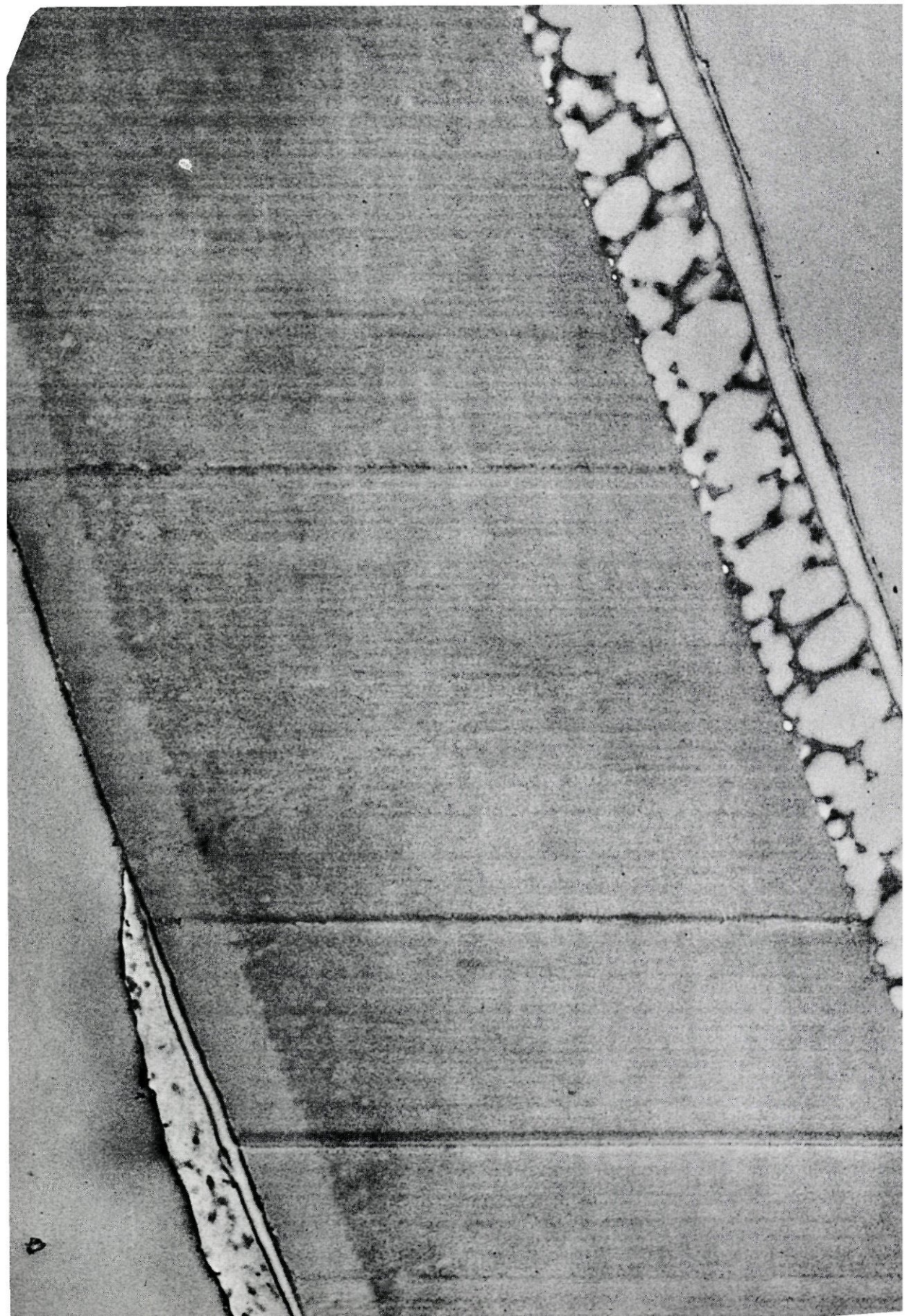
¹ Onderzoek van Ir.R.H.Cobben ³⁶⁾ van de Afdeling Entomologie van de Landbouwhogeschool.



Figuur 17, vergroting 45.000 x

Een radiale coupe van de eischaal van *Microvelia reticulata* (familie Veliidae), is afgebeeld in figuur 17. Evenals bij de Hebrus het geval was, worden ook hier de eieren afgezet in een vochtig milieu. De eischaal is bij deze soort echter sterk geperforeerd. De gelei-achtige substantie die om de uitsteeksels is gespannen, zwelt op in water en heeft tot functie al te grote vochtigheidsschommelingen van de omgeving te nivelleren. In tegenstelling tot de afbeelding op de vorige pagina, waarbij de geleilaag niet is gezwollen, is dit wel het geval bij de afbeelding in figuur 17: de schaal van een afgezet ei van *Microvelia*.

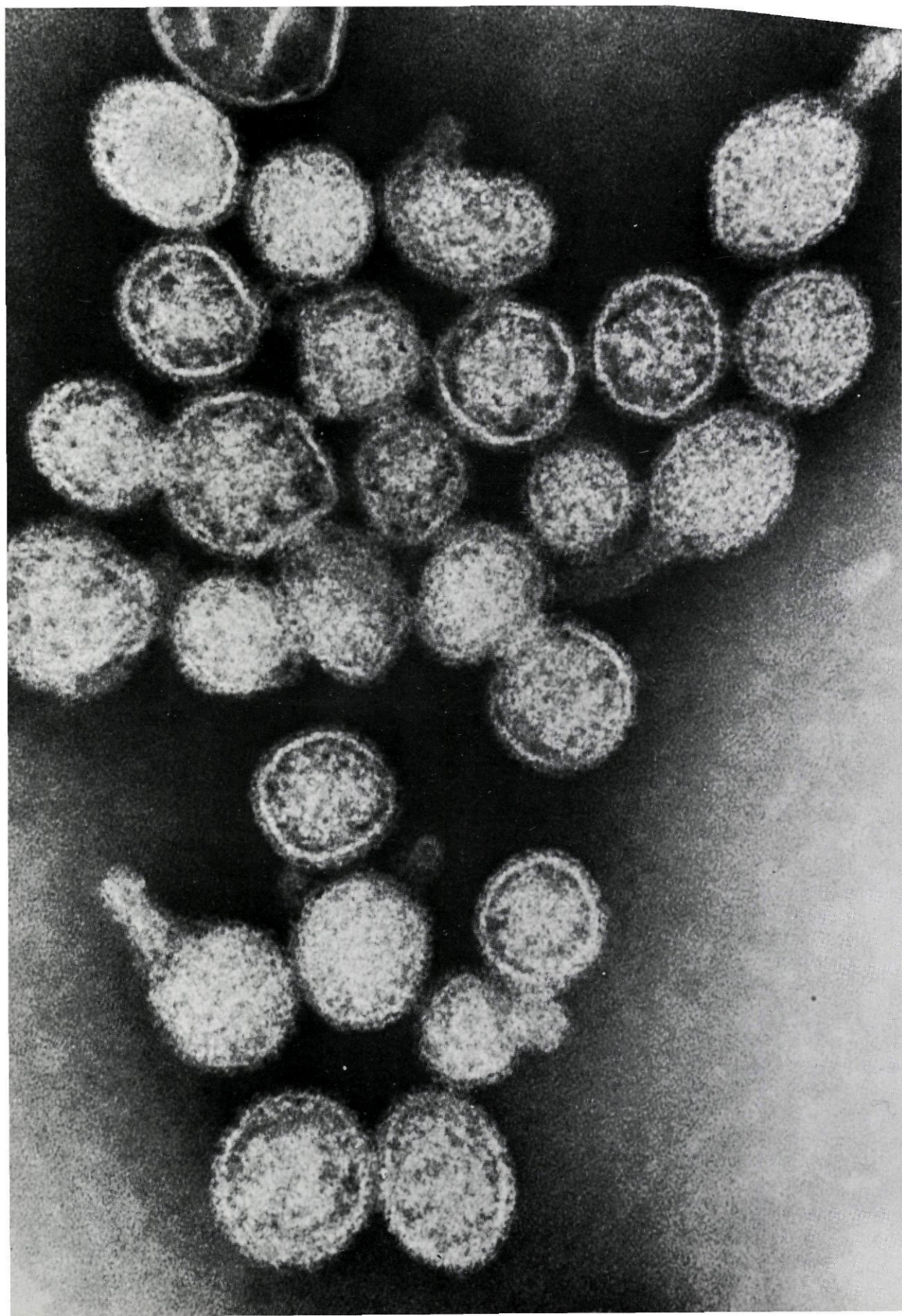
Het preparaat werd niet gekleurd.



Figuur 18, vergroting 22.000 x

Een dwarsdoorsnede van een ei van *Reduvius personatus* (familie Reduviidae), dat in een droog milieu wordt afgezet is weergegeven in figuur 18.

Dit is een typisch land-ei waarvan het embryo te gronde gaat wanneer het ei langdurig onder water ligt. De binnenste zone van de schaal vormt een open netwerk, dat door middel van luchtkanalen aan de voorpool van het ei in verbinding staat met de atmosferische lucht.



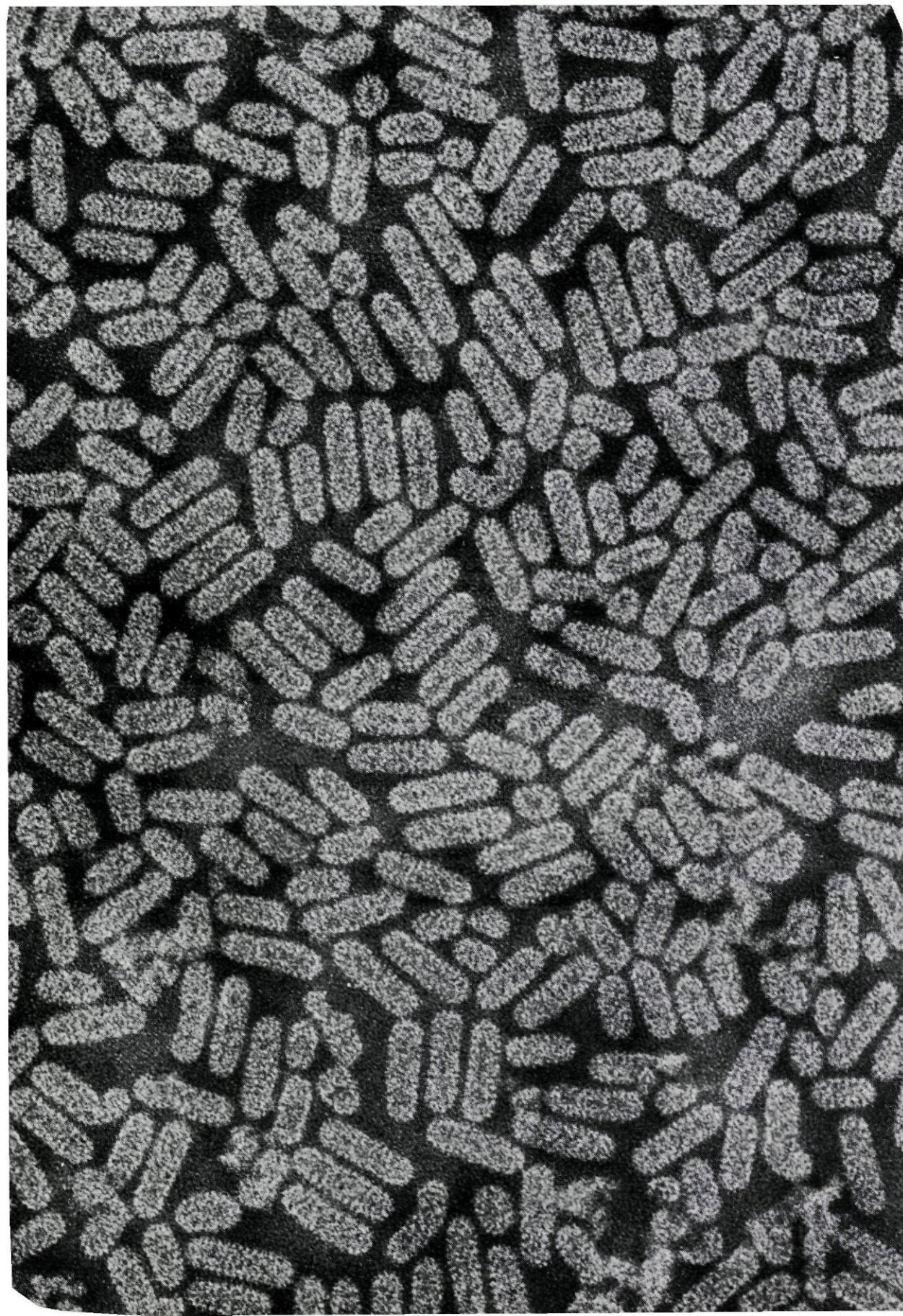
Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 19, vergroting 28.000 x

Het Tomato spotted wilt virus (TSWV) is de verwekker van de bronsvlekkenziekte bij de tomaat. Ook een groot aantal andere sier- en voedingsgewassen kunnen door dit virus geïnfecteerd worden. Dit virus kan uit de plant geïsoleerd worden door fractioneren van een bladhomogenaat gevolgd door centrifugeren in een dichtheidsgradient.

Op de foto zien we een opname van dit virus, waarbij uitgegaan is van een gezuiverde suspensie waaraan fosforwolfraamzuur (PTA) toegevoegd is om een negatief contrast te verkrijgen. De afmetingen van de deeltjes op deze foto zijn ca. 100 mμ. In situ zullen de deeltjes meestal kleiner zijn, maar in het preparaat worden de deeltjes als gevolg van de oppervlaktespanning van de PTA-oplossing enigszins afgeplat. Het doel van dit onderzoek was, de structuur van het virus na te gaan. Daarbij is gebleken dat dit virus een aparte plaats inneemt onder de bolvormige virussen, doordat het een membraan bezit, dat het virusdeeltje omhult.

¹ Onderzoek verricht in samenwerking met Dr.A.van Kammen en Ir.T.S.Ie ³²⁾
van de Afdeling Virologie van de Landbouwhogeschool.



Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 20, vergroting 320.000 x

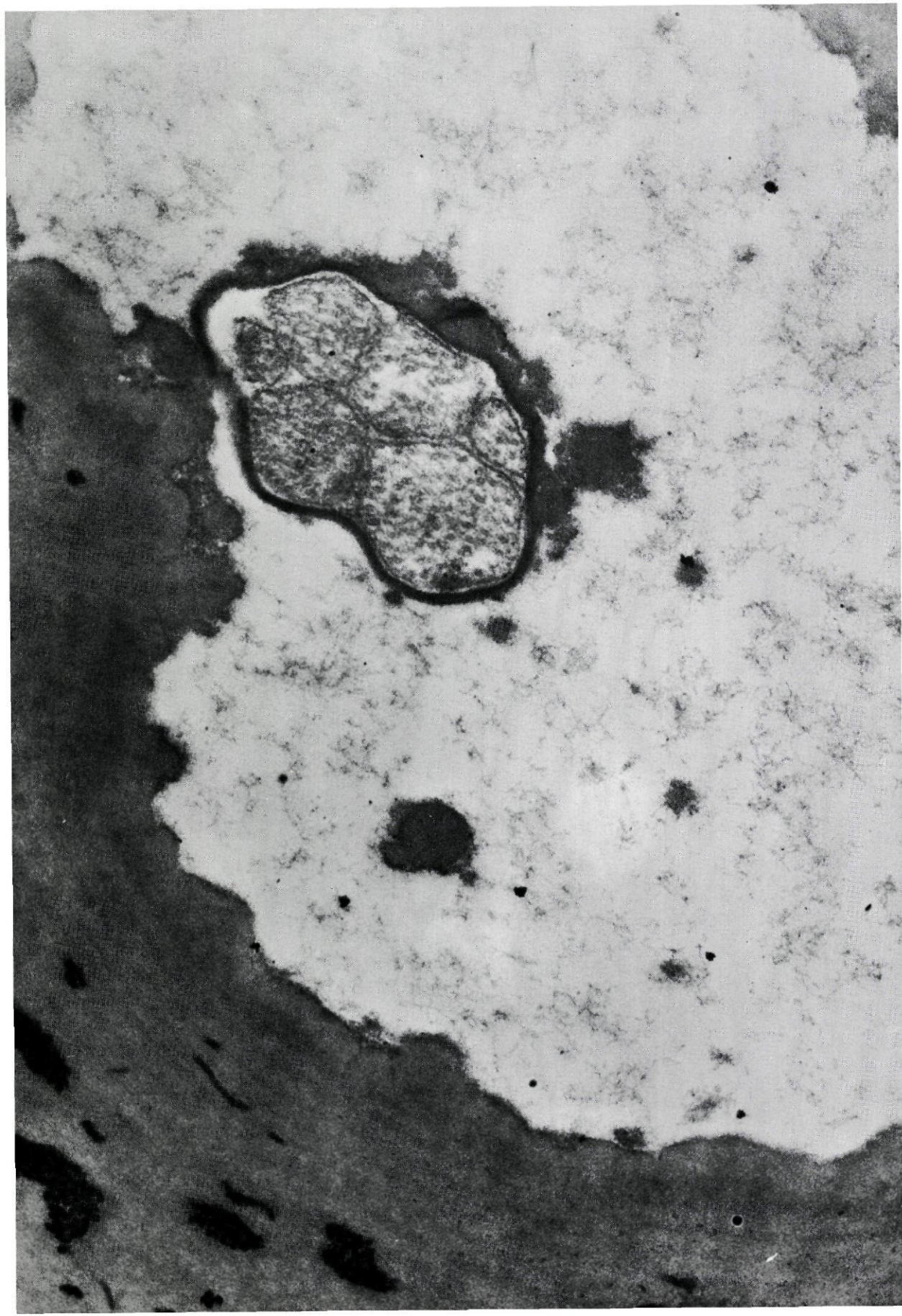
Het luzernemozaiekvirus is een polymorf virus, Er zijn tenminste vijf componenten bekend, die door ultracentrifugeren gescheiden kunnen worden, namelijk de bodemcomponent (56 x 18 mμ), de middencomponent (46 x 18 mμ), top b-(36 x 18 mμ), top a-(25 mμ Ø) en top 0 component (20 mμ Ø).

Deze vijf componenten komen allen op nevenstaande foto voor.

Door de eigenaardige structuur van het virus behoort het tot de groep van de bolvormige virussen. De subeenheden vormen ringen, welke op elkaar gestapeld zijn in tegenstelling tot de staafvormige virussen, waarbij we altijd met een spiraal te maken hebben.

Het virus kan op een grote hoeveelheid waardplanten voorkomen en kan op vele manieren overgebracht worden. Het heeft tot nog toe geen grote plagen veroorzaakt en men treft het vooral aan op luzerne en op sommige gewassen die naast een luzerneveld verbouwd worden.

¹ Onderzoek van de heer M.Verhoyen van het Laboratorium voor Phytopathologie van de Katholieke Universiteit van Leuven, gastmedewerker van de Afdeling Virologie van de Landbouwhogeschool.



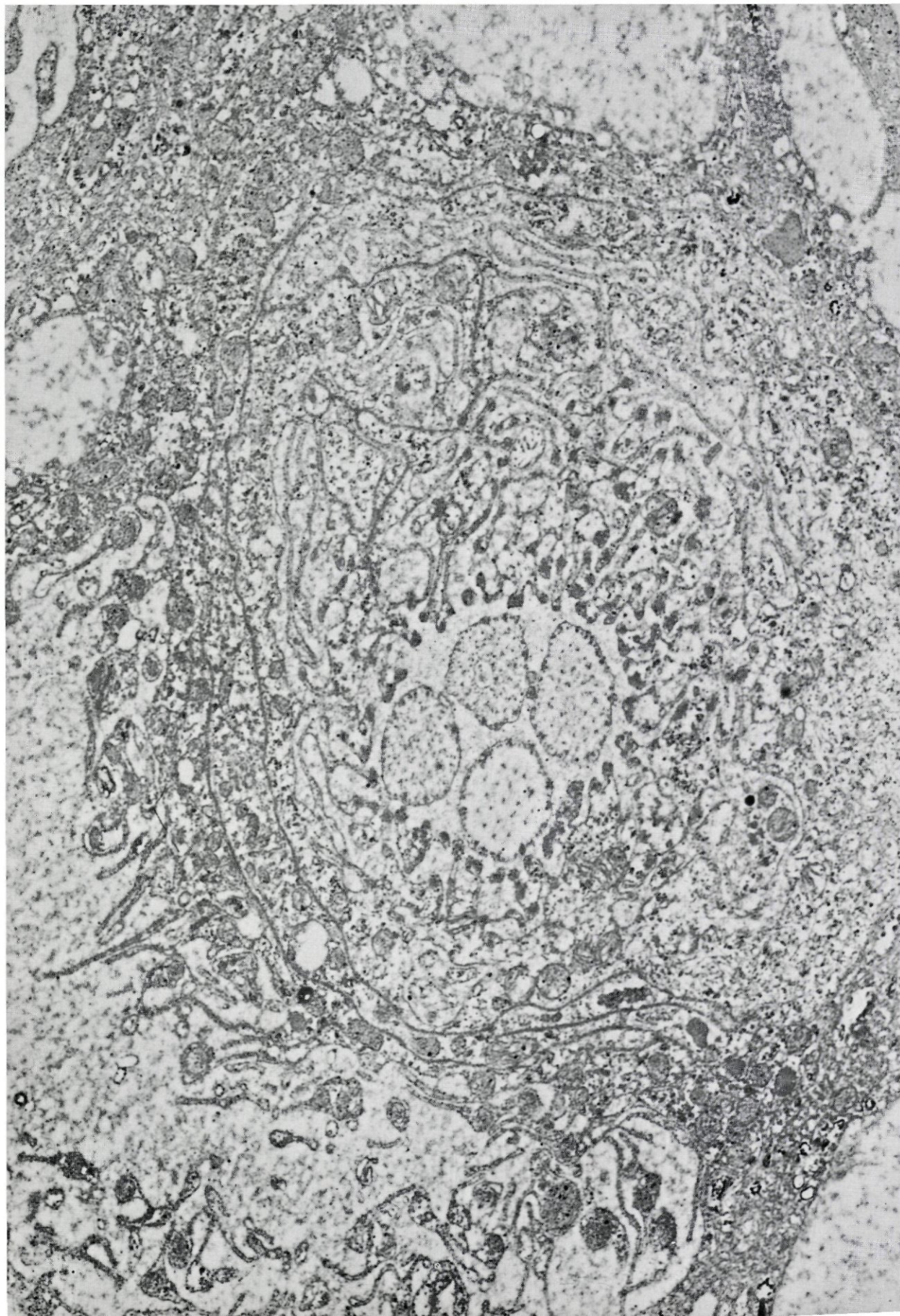
Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 21, vergroting 70.000 x

Figuur 22, vergroting 17.500 x

In de opname is de dwarsdoorsnede weergegeven door het uiterste topje van één van de vier smaakharen rond de mond van de rups. Binnen de uit chitine opgebouwde schede zijn zes zenuwuitlopers zichtbaar, afkomstig van vier smaakcellen waarvan de cellichamen nabij de basis van de haar zijn gelokaliseerd. De zenuwuitlopers zijn in het topje van de haar aan de buitenwereld blootgesteld en kunnen worden geprikkeld door verschillende stoffen in opgeloste toestand. Een prikkeling wordt in de vorm van een elektrisch signaal door de afgebeelde uitloper naar het zenuwcellichaam geleid, vanwaar het na enige modificatie wordt doorgegeven naar de hersenen.

¹ Onderzoek van Dr.L.M.Schoonhoven en Dr.V.G.Dethier ³¹⁾ van de Afdeling Entomologie van de Landbouwhogeschool.



Figuur 22, vergroting 17.500 x

De afbeelding in figuur 22 geeft de dwarsdoorsnede door vier zenuwuitlopers van de antenne van een pijlstaartrups. Deze uitlopers, afkomstig van vier zintuigzenuwcellen, vertakken zich tot een zeer groot aantal kleine vrije zenuwuiteinden die in één van de zes op de antenne aanwezige reukkegeltjes in verbinding staan met de buitenlucht en die door geurstoffen kunnen worden geprikkeld. Rond de zenuwuitlopers zijn de gecompliceerde structuren van accessorische cellen zichtbaar.



Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 23, vergroting 35.000 x

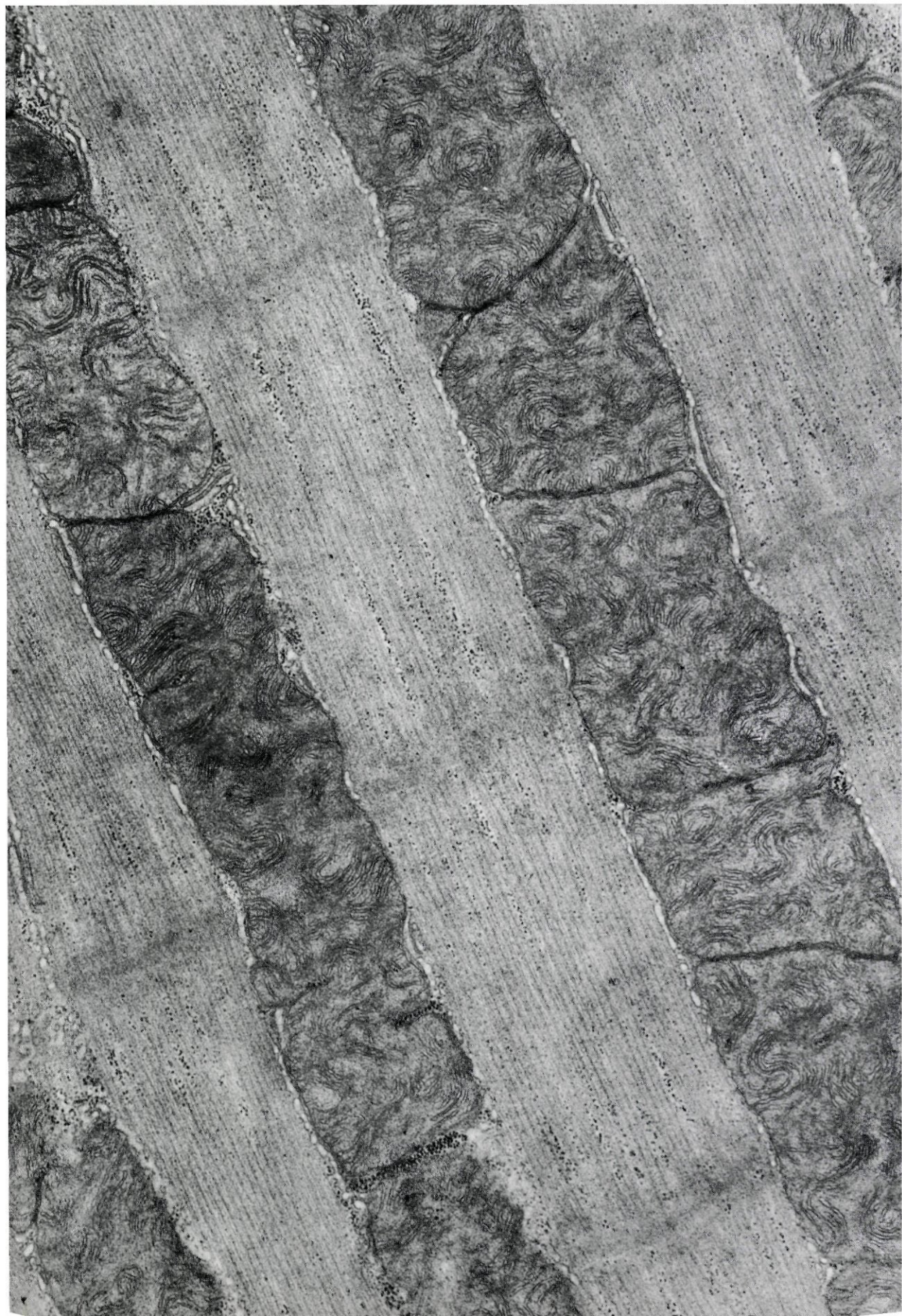
Figuur 24, vergroting 35.000 x

Om na te gaan of er in de structuur van de vliegspier van sprinkhanen veranderingen optreden als gevolg van hormonale invloeden, werden coupes gemaakt van vliegspieren. Hoertoe werden de spieren eerst gefixeerd in glutaraaldehyde en nagefixeerd met osmiumtetroxyde. Na ontwatering in een alcoholreeks werden de spieren via propyleenoxyde ingebed in Epon 812, een epoxhars. Vervolgens werden hiervan coupes gesneden op het LKB ultramicrotoom met een glasmaas. Om het contrast in de coupes te verhogen werd nagekleurd met een oplossing van loodcitraat.

Figuur 23 geeft een dwarsdoorsnede van de vliegspier waarin verschillende structuren kunnen worden onderscheiden.

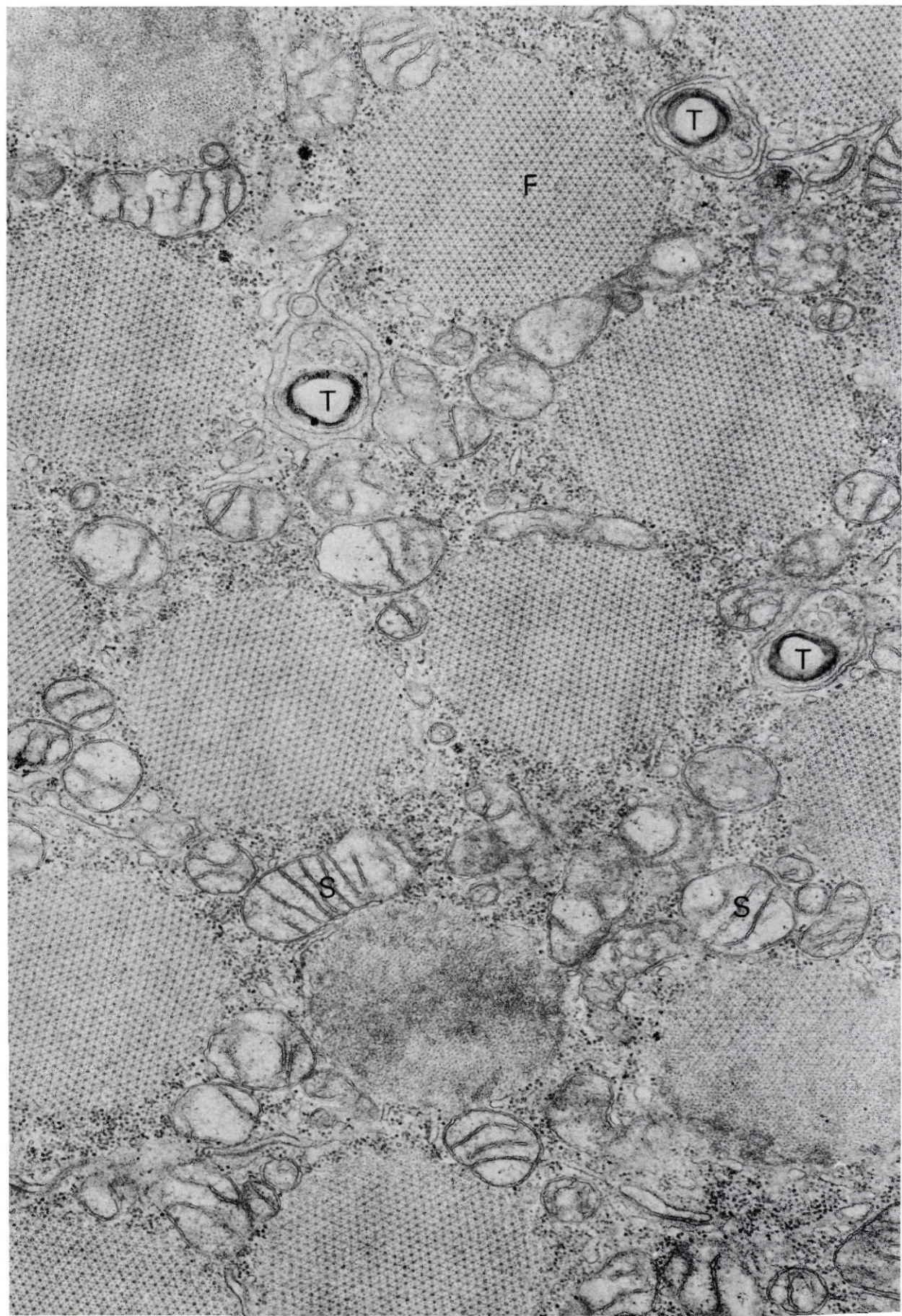
Het luchttransport in de spier vindt plaats door middel van de tracheolen (T) terwijl de sarcosomen (S) een belangrijke rol spelen bij de ademhaling. Verder kunnen we o.a. nog een celkern (K) onderscheiden en de spierfibrillen die opgebouwd zijn uit filamenten (F) welke, omdat het hier een dwarsdoorsnede betreft, als puntjes of cirkeltjes zichtbaar zijn.

¹ Onderzoek van Ir.A.K.Minks van de Afdeling Entomologie van de Landbouwhogeschool.



Figuur 24, vergroting 35.000 x

In de langsdoorsnede van de vliegspier van de sprinkhaan, figuur 24, kunnen twee gebieden onderscheiden worden, die elkaar afwisselen, namelijk de fibrillen en de mitochondriën, welke bij spierweefsels sarcosomen worden genoemd. De fibrillen zijn opgebouwd uit filamenten, die als dunne lijntjes zichtbaar zijn. Dwars op de fibrillen zijn de zogenaamde banden zichtbaar, die verantwoordelijk zijn voor de naam: dwarsgestreepte spier. De smalle donkere band wordt de I-band, het overige gedeelte de A-band genoemd. Deze banden liggen op regelmatige afstanden van elkaar. Het gebied tussen de middens van twee op elkaar volgende I-banden draagt de naam sarcomeer. De filamenten zijn opgebouwd uit twee typen eiwit, namelijk actine en myosine. Een belangrijke energiebron voor de spiercontractie is glycogeen, dat als donkere korreltjes in de fibrillen zichtbaar is.



OPNAME VAN EEN DWARSDOORSNEDE VAN EEN VLEGSPIER VAN DE COLORADOKEVER ¹
(1966)

Siemens elektronenmicroscoop Elmiskop I

Figuur 25, vergroting 35.000 x

Uit biochemische onderzoeken is komen vast te staan, dat er onder hormonale invloeden veranderingen optreden in de energiestofwisseling van de sarcosomen.

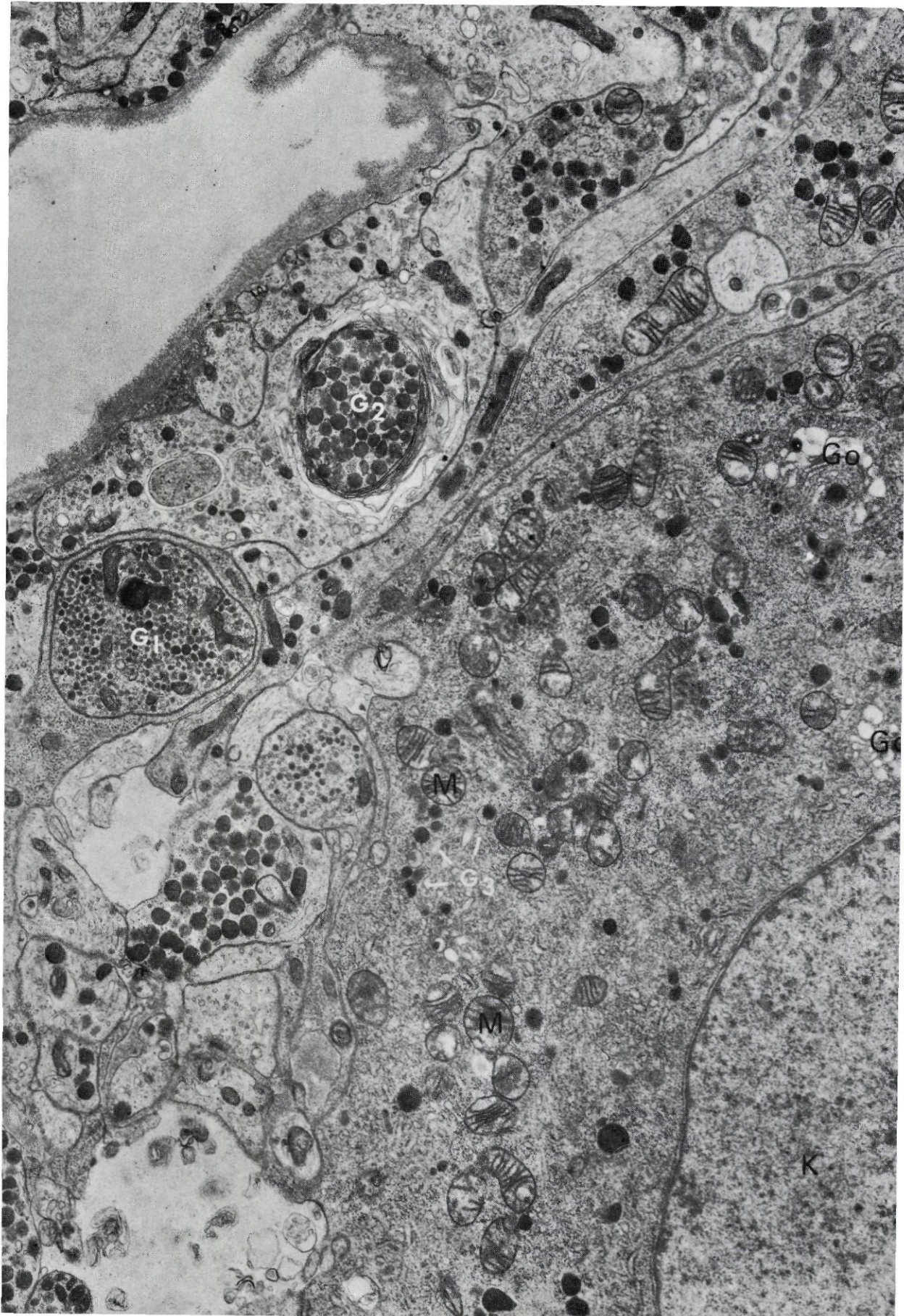
Het elektronenmicroscopisch onderzoek van de vliegspier van de coloradokever heeft tot doel na te gaan of de resultaten van het biochemisch onderzoek verband houden met de structuurveranderingen die in de spieren optreden. De structuurveranderingen die kunnen plaatsvinden betreffen o.a. de dikte van de fibrillen en de grootte en dichtheid van de sarcosomen.

In de opname kunnen de volgende organellen onderscheiden worden: tracheolen (T), sarcosomen (S) en de uit filamenten (F) opgebouwde fibrillen.

Als fixatiemiddel is glutaaraldehyde gebruikt, gevolgd door fixatie met osmiumtetroxyde.

De preparaten zijn ingebed in Epon 812.

¹ Onderzoek van Drs.C.A.D.de Kort van de Afdeling Entomologie van de Landbouwhogeschool.



OPNAMEN VAN HET CORPUS CARDIACUM VAN DE COLORADOKEVER (LEPTINOTARSA
DECEMLINEATA SAY) ¹ (1966)

Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 26, vergroting 17.500 x

Figuur 27, vergroting 40.000 x

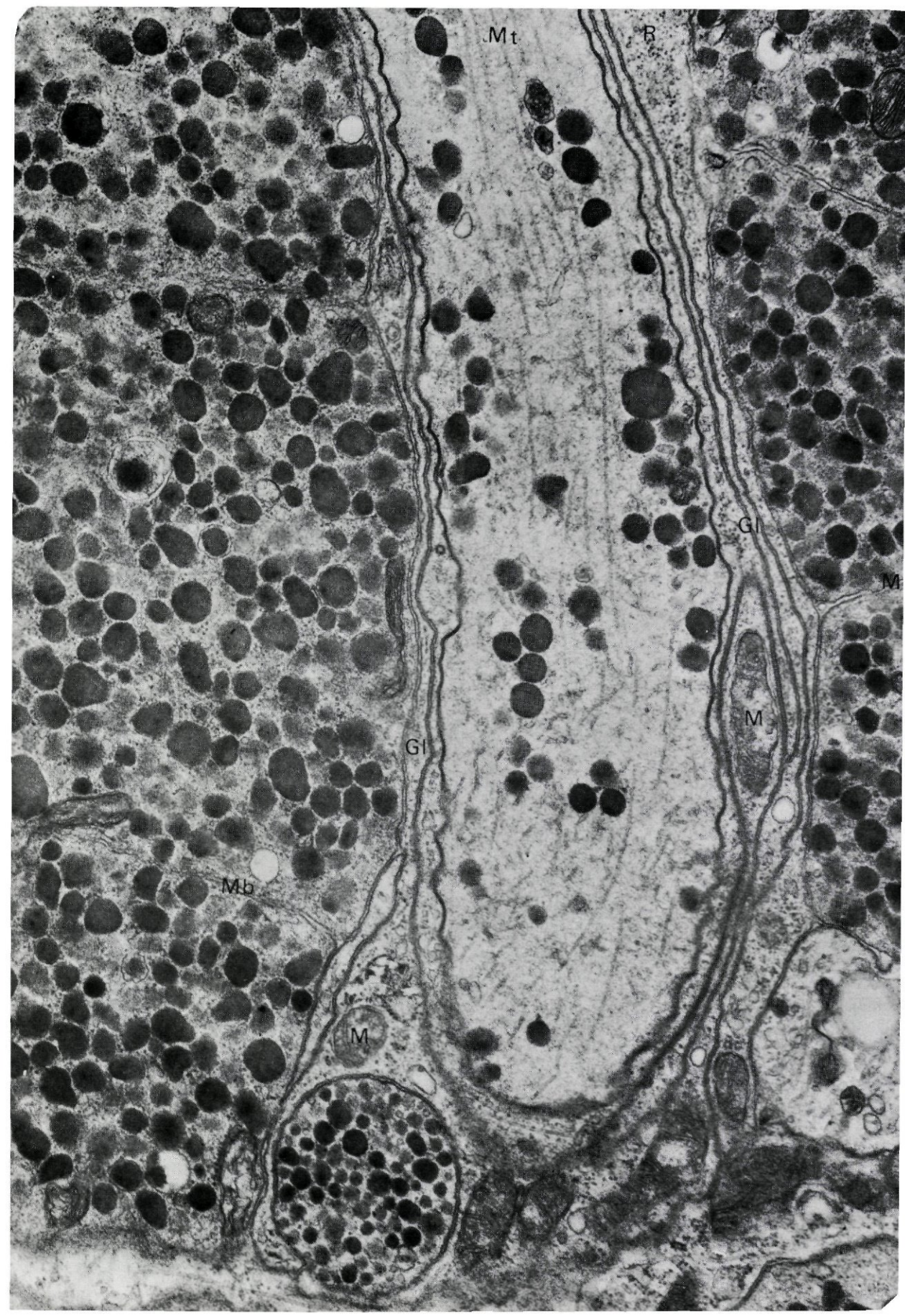
De Corpora cardiaca van insecten zijn kleine orgaantjes die in de kop liggen, vlak achter de hersenen. Aanvankelijk werden ze aangezien voor gangliën; sinds een twintigtal jaren echter, werd hun belangrijke functie binnen het geheel van de hormonale regulatie onderkend.

In verschillende soorten van gemodificeerde neuronen van het zogenaamd neurosecreet, zichtbaar als granula, wordt door de axonen van deze cellen vervoerd naar de Corpora cardiaca, waar het enige tijd kan worden opgeslagen. Waarschijnlijk door zenuwimpulsen wordt het aan de haemolymfe afgegeven waarna het pas zijn specifieke activiteit kan ontplooiën.

De preparaten zijn gefixeerd in glutaaraldehyde, nagefixeerd met osmiumtetroxyde en ingebed in Epon 812. Om het contrast te verhogen is nagekleurd met loodcitraat.

Uit figuur 26 blijkt de buitengewoon gecompliceerde bouw van Corpora cardiaca. Het meest opvallend zijn de ronde donkere neurosecreetgranula binnen de in dwars- en lengterichting doorgesneden axonen; andere staan practisch in contact met de haemolymfe. De grootteverschillen van de granula (vergelijk G_1 en G_2) hebben mogelijk iets te maken met de plaats van herkomst en de aard van het hormoon dat ze bevatten. Het rechter ondergedeelte van de foto toont een stuk van een klier cel en kern (K) met in het cytoplasma een aantal Golgicomplexen (Go) en mitochondriën (M). Gezien ook de talrijke granula (G_3) produceert deze cel eveneens neurosecreet.

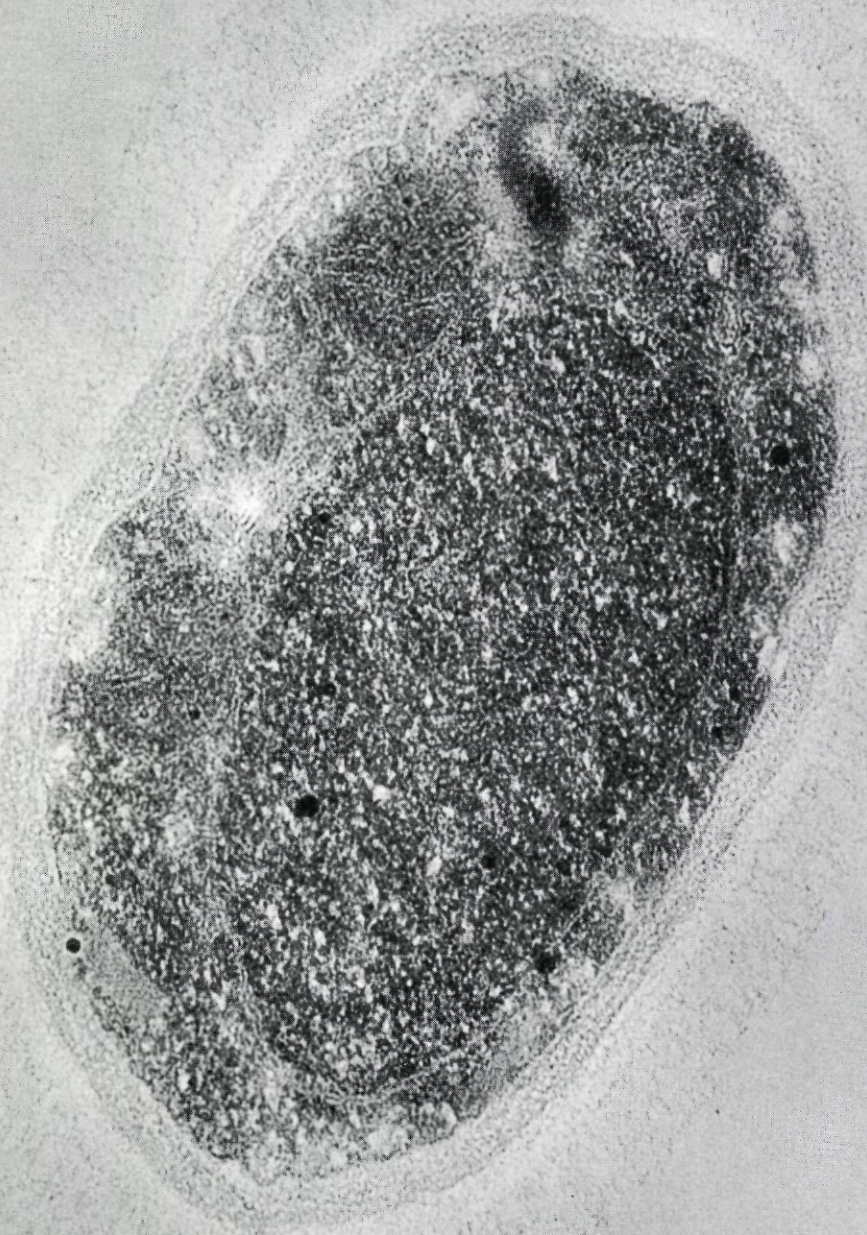
¹ Onderzoek van Drs.H.Schooneveld van de Afdeling Entomologie van de Landbouwhogeschool.



Opnamen van het corpus cardiacum van de coloradokever (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

Figuur 27, vergroting 40.000 x

Het corpus cardiacum, afgebeeld in figuur 27, toont een aantal ophopingen van neurosecretorische granula in 'axon swellings', doorsneden door een axon die granula aanvoert en waarin zeer fraai de zogenaamde 'microtubules' (Mt) zijn te zien. De opzwellingen van de axonen zijn hier duidelijk van elkaar gescheiden door membranen (Mb); licht-microscopisch geeft een aantal aangrenzende opzwellingen de indruk van een structuurloze donkere vlek. De centraal gelegen zenuw is van de opzwellingen gescheiden door een paar lamellaire glia-cel uitlopers (Gl) met mitochondriën (M) en ribosomen (R) die het zenuwweefsel voorzien van voedingsstoffen en mogelijk een rol spelen bij de prikkelgeleiding. Enkele granula zijn duidelijk begrensd door een membraan.



Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

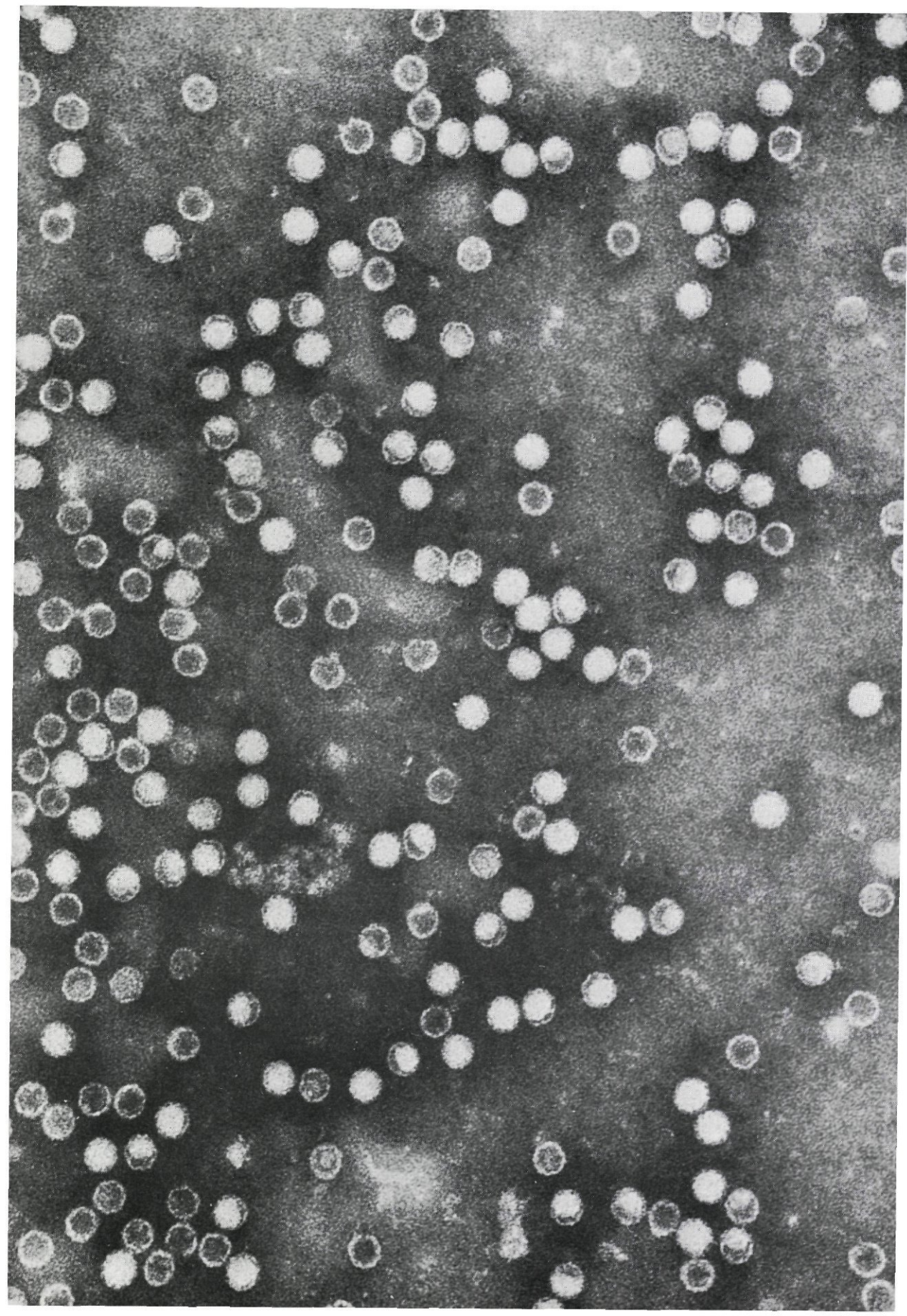
Figuur 28, vergroting 100.000 x

Voor een onderzoek betreffende de phyllosfeer moest het inwendige van gistcellen afgebeeld worden, terwijl de structuur van de uitscheidingsproducten in de onmiddellijke omgeving van de celwand bewaard moest blijven. Om dit te realiseren werd een techniek ³⁵⁾ uitgewerkt voor het inbedden van gistcellen in vestopal, waarbij het niet nodig is de gistsuspensie te centrifugeren. Hiertoe werden kleine luchtbelletjes in agar met behulp van een injectienaald gevuld met een vrij geconcentreerde suspensie van gist in glutaraldehyde (5% in Sörensen-buffer). Het door de injectienaald in de agar geprikte gaatje werd met een hete prepareernaald dichtgesmolten. Kleine agarblokjes met een gevulde luchtbel in het midden konden daarna worden gefixeerd, ontwaterd en ingebed volgens een voor weefselblokjes gebruikelijke methode.

Het zo verkregen materiaal werd gesneden met behulp van een diamantmes op een LKB ultramicrotoom. De coupe is nagekleurd met loodcitraat volgens de methode van E.S.Reynolds.

Figuur 28 geeft een detail uit een doorsnede van een met gist gevulde luchtbel.

¹ Onderzoek van mejuffrouw Dr.J.Ruinen van de Afdeling Microbiologie van de Landbouwhogeschool.



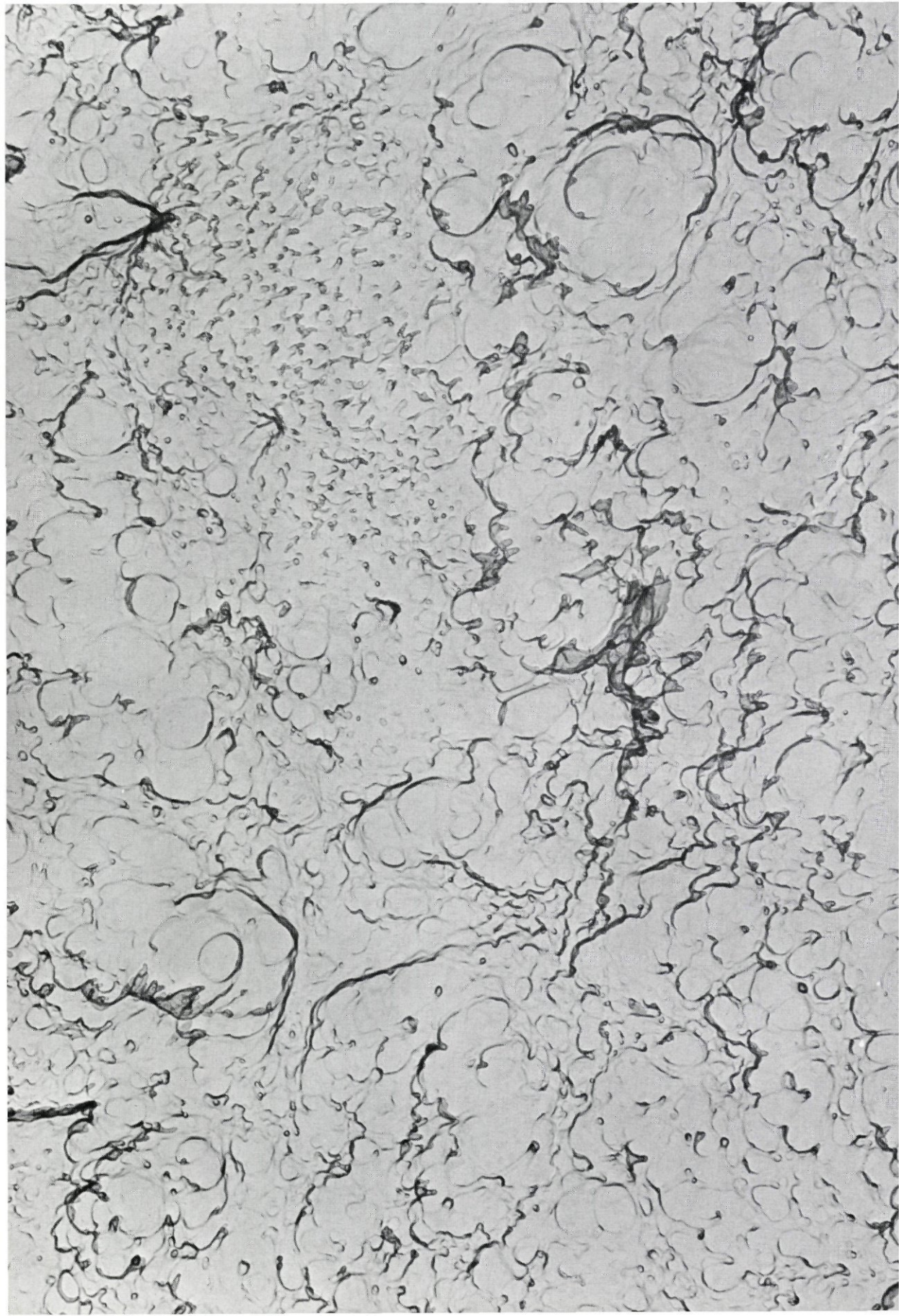
Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 29, vergroting 280.000 x

In het onderzoek over de zuivering van het bladrolvirus uit de bladluis *Myzus persicae* werden virus-achtige deeltjes gevonden in extracten van bladluizen met behulp van de elektronenmicroscop. Deze deeltjes, die een afmeting van 24 mμ hebben, bleken niet de veroorzakers van de bladrol-ziekte van de aardappel te zijn. In verder onderzoek naar de aard van deze deeltjes werd vastgesteld dat het virussen waren. Een waardplant die na besmetting reageerde met symptomen werd nog niet gevonden. Hierdoor was elektronenmicroscopie van wezenlijk belang om de aanwezigheid van deze deeltjes in bladluizen en planten vast te stellen en konden alleen die problemen worden bestudeerd, die met de elektronenmicroscop toegankelijk waren.

In figuur 29 zijn naast volle ook lege deeltjes te vinden. De deeltjes vertonen ronde tot bijna zeshoekige profielen. In sommige deeltjes kunnen eiwit-elementen worden opgemerkt, waaruit de eiwitmantel van het virus is opgebouwd.

¹ Onderzoek van Ir.D.Peters ^{29 35)} van de Afdeling Virologie van de Landbouwhogeschool.



Siemens elektronenmicroscoop Elmiskop I

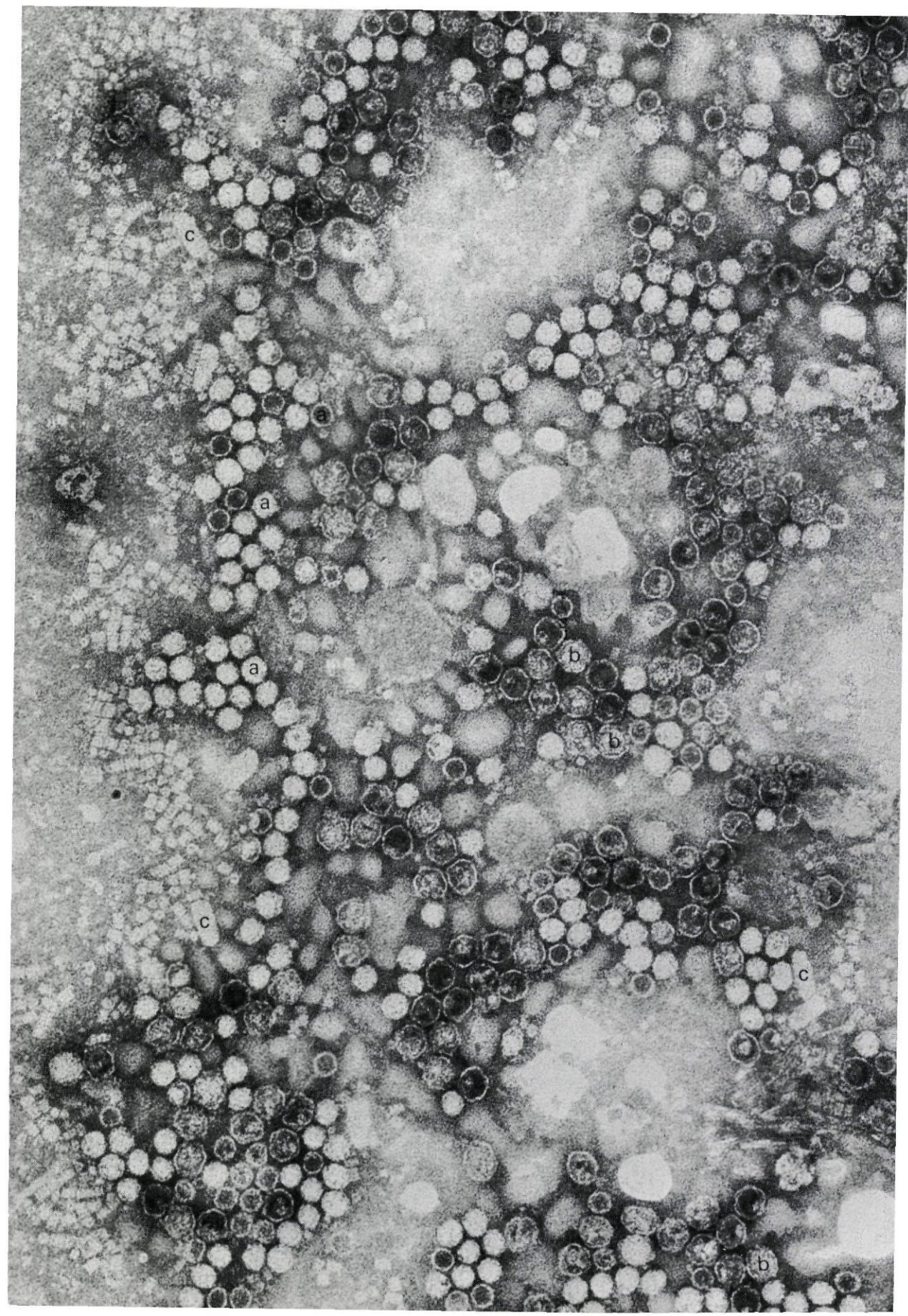
Figuur 30, vergroting 35.000 x

Een opname van een replica van de oppervlakte van een ei, dat met warm water is gewassen, is afgebeeld in figuur 30. Het buitenste laagje van het ei, de cuticula, die dient ter bescherming van de ei-inhoud tegen verdamping en schadelijke stoffen, bestaat uit blaasjes.

Deze blaasjes zijn tengevolge van het wassen plaatselijk wat vervlakt, maar de oppervlaktestructuur wijkt slechts weinig af van die van ongewassen eieren. Derhalve mag worden geconcludeerd dat door het wassen de cuticula vrijwel intact is gebleven.

Het gebruikte preparaat is een zogenaamd 2-traps koolstofreplica. Hiertoe is een gedeelte van de schaal bestreken met een oplossing van 2% formvar in chloroform, waardoor zich een dun formvar-vlies op het oppervlak vormt. Na droging wordt een laagje van 7% bedacryl, opgelost in xyleen, aangebracht ter versteviging. Met een stukje cellofaanplakband kan het formvar-vliesje met de bedacryl er afgetrokken worden. Op deze wijze is een negatieve afdruk van het eioppervlak verkregen. Hiervan wordt een positieve afdruk gemaakt door de negatieve afdruk met koolstof op te dampen en daarna de negatieve afdruk op te lossen.

¹ Onderzoek van Dr.P.C.M.Simons van het Instituut voor Pluimveeteelt 'Het Spelderholt', Beekbergen en Dr.G.Wiertz van de Afdeling Fysiologie der Dieren van de Landbouwhogeschool.³³



Siemens elektronenmicroscop Elmiskop I

Figuur 31, vergroting 160.000 x

De champignoncultuur wordt ernstig bedreigd door de zogenaamde 'afsterfingsziekte', die waarschijnlijk veroorzaakt wordt door één of meer virussen. Uit zieke champignons kunnen vaak drie verschillende soorten virus-achtige deeltjes geïsoleerd worden: een bolvormig deeltje van 25 mμ(a), een bolvormig deeltje van 34 mμ(b) en een staafvormig deeltje met afgeronde einden van 19 x 50 mμ(c). De zuivering van deze partikeltjes omvat onder andere behandeling van de champignonpulp met ultrasone trillingen om de celwanden stuk te maken, toepassing van enkele organische oplossingen, en differentiële centrifugeren. Hierna kan een elektronenmicroscopisch voldoende zuiver beeld worden verkregen. Elektronenmicroscopie is tot nu toe de enige snelle toetsmethode op de aanwezigheid van deze virusdeeltjes, aangezien de serologie nog niet voldoende ontwikkeld is, en er tot op heden geen planten op de deeltjes hebben gereageerd met symptomen.

¹ Onderzoek van mevrouw Ir.A.Dieleman-van Zaayen van het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek.

Gepubliceerde onderzoekresultaten

waarbij assistentie werd verleend door de

AFDELING ELEKTRONENMICROSCOPIE VAN DE STICHTING TECHNISCHE EN FYSISCHE
DIENST VOOR DE LANDBOUW

1. Ragetli, H.W.J. Onderzoekingen over een virus-remstof voorkomend
in *Dianthus cariophyllus* L.
Dissertatie (1957) Landbouwhogeschool, Wageningen.
2. Van Hoof, H.A. On the mechanism of transmission of some plant
viruses.
Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wet. Series C. 60 nr.3
(1957)
3. Kole, A.P. Elektronenmicroscopische waarnemingen over de
zoösporen uit de Zomersporangia van *Synchytrium*
endobioticum (Schilb.) Perc.
T.Pl.ziekten 63 (1957) 361 - 364.
4. Van Hoof, H.A. Onderzoekingen over de biologische overdracht van
een non-persistent virus.
Dissertatie (1958) Landbouwhogeschool, Wageningen.
5. Hagedoorn, D.J.; The red clover vein-mosaic virus in the Netherlands.
Bos, L. en van der T.Pl.ziekten 65 (1959) 13 - 23.
Want, J.P.H.
6. Bos, L.; Delević, B.; en van der Want J.P.H. Investigations on white clover mosaic virus.
T.Pl.ziekten 65 (1959) 89 - 106.
7. Liem, S.N. Cucumis virus 2 in Nederland
T.Pl.ziekten 65 (1959) 158 - 160.
8. Kole, A.P. en Electron microscope observations on the flagella
Horstra, K. of the zoöspores of *Phytophthora infestans*
Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wet. Series C. 62 nr.4
(1959)
9. Dijkstra, J. en Serological and electron microscopical investi-
Grancini, P. gations of the relationship between *Sorghum* red
stripe virus and sugar cane mosaic virus.
T.Pl.ziekten 66 (1960) 295 - 300

10. Dijkstra, J. en Grancini, P. Electron microscopical investigations of mosaic diseased wheat plants found in Italy. *T. Pl.ziekten* 66 (1960) 301 - 305.
11. Kole, A.P. en Gielink, A.J. Electron microscope observations on the flagella of the zoösporangial zoöspores of *Plasmodiophora brassicae* en *Spongospora subterranea*. *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wet. Series C.* 64 nr. 2 (1961)
12. Koenigs, F.F.R. The mechanical stability of clay soils as influenced by the moisture conditions and some other factors.
Dissertatie (1961) Landbouwhogeschool, Wageningen.
13. Kole, A.P. en Gielink, A.J. Electron microscope observations on the resting-spore germination of *Plasmodiophora brassicae*. *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wet. Series C.* 65 nr. 1 (1962)
14. Simons, P.C.M. en Wiertz, G. Notes on the structure of membranes and shell in the hen's egg. *Zeitschr. für Zellforschung* 59 (1963) 555 - 567.
15. Stegwee, D.; Kimmel, E.C.; de Boer, J.A. en Henstra, S. Hormonal control of reversible degeneration of flight muscle in the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera) *J. Cell Biol.* 19 (1963) 519 - 527.
16. Van Kammen, A. The occurrence of infections virus ribonucleic acid in the ribosomal fraction from tobacco mosaic virus infected tobacco leaves.
Dissertatie, (1963) Universiteit van Amsterdam.
17. Van der Want, J.P.H. Enige nieuwe vorderingen in de plantevirologie. *Meded. Dir. Tuinb.* 26 (1963) 420 - 427.
18. Stegwee, D. Respiratory chain metabolism in the colorado potato beetle-II; Respiration and oxidative phosphorylation in 'Sarcosomes' from diapausing beetles.
J. Ins. Physiol. 10 (1964) 97 - 102.
19. Agrawal, Hari Om Identification of cowpea mosaic virus isolates.
Dissertatie (1964) Landbouwhogeschool, Wageningen.
20. Ponsen, M.B.; Henstra, S. en van der Scheer, C. Electron Microscope study of two nuclear polyhedral viruses.
Proceedings Third European Regional Conference on Electron Microscopy, Praag (1964).

21. Ie, T.S. An electron microscope study of tomato spotted wilt virus in the plant cell.
Neth. J. Plant Path. 70 (1964) 114 - 115.
22. Agrawal, Hari Om Electron microscope observations on the structure of the protein shell of turnip yellow mosaic virus.
Neth. J. Plant Path. 70 (1964) 175 - 179.
23. Bos, L. en A distinct strain of red clover mottle virus in the Netherlands.
Maat, D.Z. Neth. J. Plant Path. 71 (1965) 8 - 13.
24. Ponsen, M.B.; Electron microscope observations on the structure of membranes from nuclear polyhedral viruses.
Henstra, S. en Neth. J. Plant Path. 71 (1965) 20 - 24.
van der Scheer, C.
25. Ponsen, M.B. Electron microscopy of DNA-cores in nuclear polyhedral viruses.
Neth. J. Plant Path. 71 (1965) 54 - 56.
26. Ponsen, M.B.; Electron microscope observation of nuclear polyhedra from *Malacosoma neustria* (Lepidoptera-
Henstra, S. en Lasiocampidae).
van der Scheer, C. Neth. J. Plant Path. 72 (1965) 101 - 104.
27. Brewer, J.G. en Electron microscope observations on the develop-
Boerema, G.H. ment of pycnidiospores in *Phoma* and *Ascochyta* spp.
Proceedings Kon. Ned. Akad. v. Wet. Series C. 68
nr. 2 (1965).
28. Schmidt, D.G. De vorm van caseïne-deeltjes in melk en melkpro-
dukten.
NIZO Nieuws, 11e serie-/x (1965).
29. Peters, D. The Purification of virus like Particles from
the Aphid *Myzus persicae*.
Virologie 26 (1965), 159 - 161.
30. Bos, L. Virussen en Planten, Deel II, hoofdstuk 9.
N.V.Uitgevers Mij. W.E.J.Tjeenk Willink, Zwolle,
(1965)
31. Schoonhoven, L.M. en Sensory aspects of host-plant discrimination by
Dethier, V.G. lepidopterous larvae.
Archives Néerlandaises de Zoologie Tome XVI, 4,
(1966) 497 - 530.
32. Van Kammen, A.; Morphology of Tomato Spotted Wilt Virus
Henstra, S. en Virology 30 (1966), 574.
Ie, T.S.

33. Simons, P.C. en Wiertz, G. The ultra-structure of the surface of the cuticle of the hen's egg in relation to eggcleaning. Poultry Science 45 (1966) nr.6.
34. Van der Scheer, C. Fixation and embedding of yeast cell suspensions in airbubbles in agar. Proceedings Vith Int.Congress Electr. Micr. Kyoto (1966).
35. Peters, D. The purification of Potato Leafroll virus from its Vector Myzus persicae. Virologie (ter perse)
36. Cobben, R.H. Transspecific Evolutionary trends in Heteroptera (Insecta, Hemiptera). Part I: eggs, architecture of the shell, gross embryology and eclosion. (in voorbereiding).

