

Om mikrotomsnit af pollenexiner.

Af

B. BRORSON CHRISTENSEN.

Abstract.

Microtome sectioning of Pollen-Exines.

The following is a description of a method for making very thin microtome sections of acetolysed pollen grains to facilitate study of exine structures. The most prominent features of the method is the use of concentrated acetic acid for dehydration instead of ethyl alcohol, and embedding in refined carnauba instead of paraffin.

Anstrengelserne for at nå til sikrere bestemmelser inden for pollenanalysen er her i Danmark gennem de sidste år undergået en stærk intensivering. Hidtil upågtede eller fejlbestemte fossile pollentyper er blevet gjort til genstand for indgående undersøgelser, og gennem fuld udnyttelse af gode optiske hjælpemidler er muliggjort iagttagelser af forbavsende små og komplicerede strukturdetaller i og på exinen af de undersøgte pollen. Imidlertid er det blevet klart, at gode mikrotomsnit af egnede, karakteristiske pollentyper ville bidrage stærkt, ikke blot til en korrekt opfattelse af exinens bygning hos de pågældende arter, men til en mere sikker tolkning af gjorte iagttagelser i det hele taget.

Nu er mikrotomsnit af pollenkorn i og for sig ikke noget nyt, idet der ofte i snit til brug ved kromosomtællinger tilfældigt vil forekomme gennemskårne modne eller næsten modne pollen. Men pollensnit, fremkomne ved de dertil anvendte metoder, vil kun rent undtagelsesvis være egnede til undersøgelse af exinestrukturer. Hertil må kræves, at pollenkornene er helt udvoksede, helst må de acetolyseres (for at få en større lighed med de fossile pollen), og snittykkelserne må kun være en brøkdel af exinernes tykkelse, hvilket i praksis vil sige, at de må ligge mellem 1 og 4μ . Her kommer den normalt benyttede indsmeltning- og mikrotomteknik til kort, da nemlig de acetolyserede pollenkorn er så hårde, at selv en meget

skarp mikrotomkniv vil drive dem foran sig gennem paraffinen; er de tilmed afvandede i ætylalkohol, bliver de særdeles skøre og vil i reglen slet ikke kunne skæres.

Nedenfor skal beskrives den fremgangsmåde, som jeg har fundet frem til, og som kan føre til det ønskede resultat. Den er udarbejdet på Nationalmuseets Moselaboratorium i foråret 1947. Hele processen, indtil præparaterne er fremstillet, kan gennemføres på nogle timer, eftersom pollenkornenes ringe størrelse medfører en fuldstændig gennemtrængning med de forskellige benyttede vædske i løbet af få øjeblikke. Langvarig henstand er altså overflødig, ligesom også den almindelige trinvis overgang fra een vædske til en anden har vist sig formålsløs. Af de nedennævnte processer påvirker kun acetolysen i synlig grad de faste og stabile pollenexiner.

Metodik. Det pollenmateriale, friske blomster eller herbarieeksemplarer, der ønskes behandlet, kommer i en porcellainsskål, overhældes med en 10% opløsning af kaliumhydroxyd og opvarmes til svag kogning i nogle minutter. Det hele er nu en sortebrun vælling, som bør sies. Den frasierte vædske vil indeholde størsteparten af pollenkornene fra materialet; den hældes i et centrifugeglas, hvori kornene forbliver lige til mikrotomskæringen, da al skylning og skift af vædske foregår ved centrifugering.

Kaliumhydroxyden fjernes ved skylning med 2—3 hold destilleret vand. Omhyggelig omrøring er her, som ved alle følgende skift, af vigtighed. Så følger acetolysen: Pollenkornene afvandes først med koncentreret eddikesyre (eventuelt to skift). Når denne er fjernet, tilføjes der en frisklavet blanding af 10 dele eddikesyreanhydrid og 1 del koncentreret svovlsyre. Efter hastig omrøring varmes glasset i kogende vandbad i 60 sekunder, hvorefter der skylles med flere hold koncentreret eddikesyre. Efter sidste hold af denne skiftes til ren xylol, 2—3 hold, og nogle minutters henstand. Af den sidste xylol afhældes (efter centrifugeringen) kun henvend halvdelen, pollenkornene røres godt op, og glasset hensættes i vandbadet ved ca. 80° C. Man tilsætter så under omrøring skrabet eller knust karnaubaraffinat¹⁾, indtil glasset er omtrent fuldt, og xylol-voksblendingen flyder helt klart. Derpå centrifugeres hastigt, idet glasset sættes i et

¹⁾ Karnaubaraffinat er en almindelig handelsvare omend for tiden noget svær at få fat på. Det fremstilles ved blanding af paraffin med rensat «fedtgrå» karnaubavoks og behandling af blandingen med natriumhydroxyd. Det færdige produkt er en hård, homogen, elfenbensfarvet masse, der indeholder karnaubavoksens ikke forsæbelige del og ca. 75% paraffin.

på forhånd opvarmet hylster fra centrifugen; man afhælder hurtigt og fylder straks op med smeltet, rent karnauba-raffinat. Efter omrøring og et øjeblikks henstand i vandbadet centrifugeres som før, og voksen hældes fra. De tilbageblevne dråber danner med pollen-kornene en masse, der med en varm spatel kan anbringes og formes på passende vis på en sædvanlig træklods til fastspænding i mikrotomen.

Til skæring er blevet anvendt slædemikrotomer, dels en lille ældre, dels (til snit på 1—2 μ) en moderne, meget svær og tung model. Har man vænnet sig til den benyttede voksarts ejendommeligheder, er den ganske udmærket at skære. Kniven bør ligge ret fladt, og dens æg skal stå vinkelret på skæreretningen.

Præparatfremstillingen kan ske på flere måder. Man kan bringe snittene lige fra mikrotomen over i et centrifugeglas med xylol, hvori de opløses og de enkelte snit frigøres. Når der på denne måde er tilført vædsken en stor mængde snit, centrifugeres xylofen af, og der kan fremstilles (farvede eller ufarvede) præparater enten i balsam, i dammarharpiks, eller — efter passage gennem alkohol til vand — i glyceringelatine.

Eller man kan fremstille præparater af serieopklæbte snit. Fremgangsmåden her, såvel som ved farvning, findes beskrevet i de almindelige lærebøger i mikroskopisk teknik; den er kun særegen ved de vanskeligheder, der opstår på grund af snittenes ringe tykkelse og størrelse, og som overvindes ved øvelse og omhu. Farvning er i reglen ikke nødvendig, men har dog været prøvet med forskellige stoffer, af hvilke cyanin foreløbig har vist sig som det mest hensigtsmæssige. (Se fig. 1).

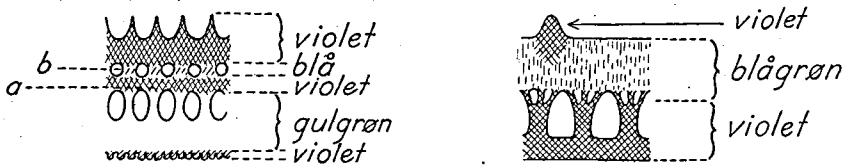


Fig. 1 viser virkningen af farvning med cyanin. Til venstre skematisk snit af exinen hos *Knautia arvensis*, til højre af *Echinops Ritro*. Se henholdsvis tavle VIII, 5 og tavle VII, 2. Det ser ud til, at farven fordeler sig efter, hvor kompakte exineelementerne er: helt kompakte dele tager øjensynlig næsten ikke imod (gulgrøn), porøse men substantielle dele tager stærkt imod (violet) og porøse, svampede dele ligeledes stærkt, men er mere gennemskinnelige (blå, blågrøn). Med a og b er betegnet to linjer, hvorefter exinen af *Knautia* synes tilbøjelig til at spalte. Saml.

Malva tavle VIII, 3.

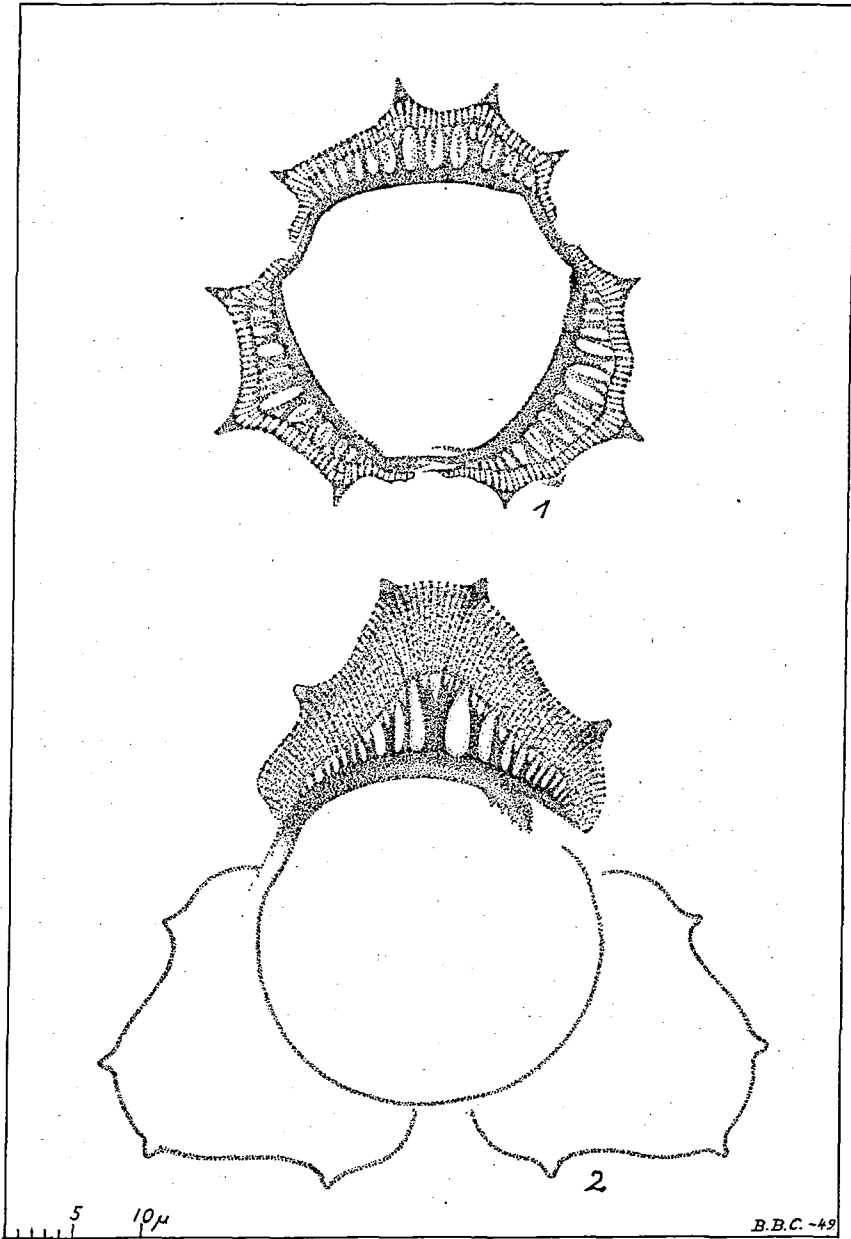
Hvadenten præparatfremstillingen har fundet sted på den ene eller den anden af de ovennævnte måder, vil man som følge af selve metoden til pollenkornenes frigørelse få en smule detritus med i præparaterne, og der vil være en mængde pollensnit af mindre direkte interesse i denne forbindelse (de første og de sidste af hvert korn), men foruden disse vil findes et væsentligt antal snit, der har ligget mere eller mindre æquatorialt på pollenkornene. Disse repræsenterer gode, klare tværsnit af exinerne, og arbejdets hensigt er dermed nået.

Det er ikke her stedet for en diskussion af slutninger, der fra forskellige synspunkter kan tænkes draget ud fra disse snit. Paradoxalt nok vil i mange tilfælde dårlige og iturevne snit vise sig mest instruktive med hensyn til exinernes dannelsesmåde eller den indbyrdes sammenhæng mellem de forskellige formelementer (se tavle VIII samt tekst til fig. 1). — Men her skal bringes en række tegninger og fotografier for at vise nogle resultater af den beskrevne fremgangsmåde. Tegningerne er udført ved en Watson 2 mm apochromat, n. a. 1,37 med okularer »holos 10 x« og achromatisk kondenser, n. a. 1,35. Af fotografierne er tavle IX, 7 udført med ovennævnte optiske udstyr, de øvrige med en Leitz achromat, » $1/_{12}$ Ol.«, n. a. 1,30, kondenser n. a. 1,40 og monochromatisk grønt lys.

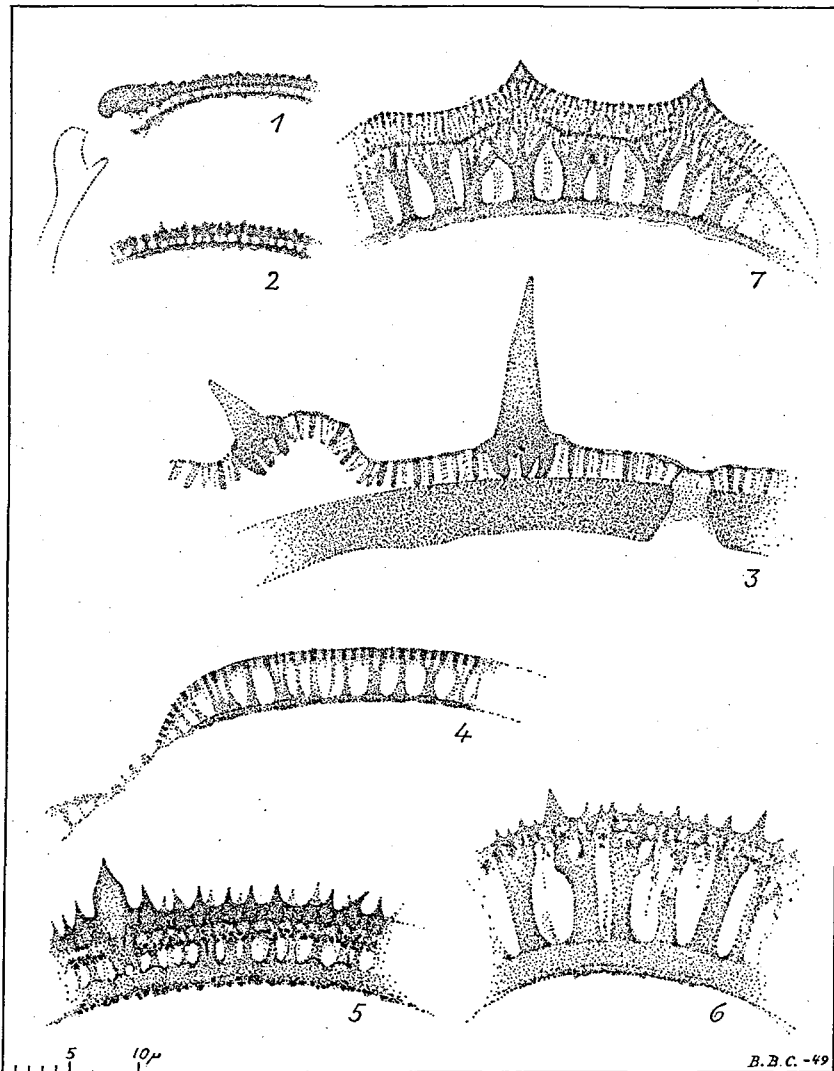
En tak vil jeg gerne rette til museumsinspektør, dr. phil. OTTO HAGERUP for gode råd og vejledning ved snitopklæbning samt for pollenmateriale af *Echinops*, endvidere til fabrikant H. K. WENGBERG for fremskaffelse af egnede vokarter til forsøgene.

LITTERATUR

- J. D. CORRINGTON: Working with the Microscope, New York 1946.
 D. A. JOHANSEN: Plant Microtechnique, New York 1940.
 C. W. OLLIVER: Intelligent Use of the Microscope, London 1947.
 B. ROMEIS: Mikroskopische Technik, München 1948.
 J. H. WREDDEN: The Microscope, its Theory and Application, London 1947.



1. *Tanacetum vulgare* L. Snit 3 μ ; svag farvning m. metyl nbl t.
2. *Echinops Ritro* Endlicher. Snit 3 μ ; opklæbet, farvet m. cyanin.

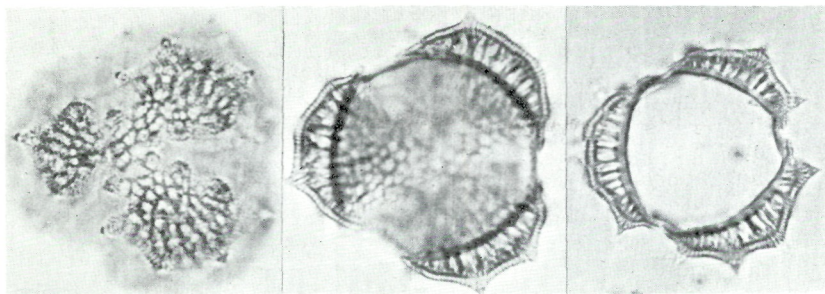


Her kun mindre dele af snittene tegnet.

1. *Betula pendula* Roth. Snit 1μ ; ufarvet.
2. *Fagus sylvatica* L. Snit 1μ ; ufarvet.
3. *Malva* sp Snit ca. 5μ ; ufarvet Exinens yderlag løsrevet til venstre
4. *Convolvulus sepium* L. Snit 2μ ; opklæbet, farvet m. cyanin.
5. *Knautia arvensis* (L.) Coult. Snit 2μ ; opklæbet, farvet m. cyanin.
6. *Scabiosa columbaria* L. Snit 3μ ; ufarvet.
7. *Saussurea alpina* (L.) D. C. Snit 3μ ; ufarvet.

TAVLE IX

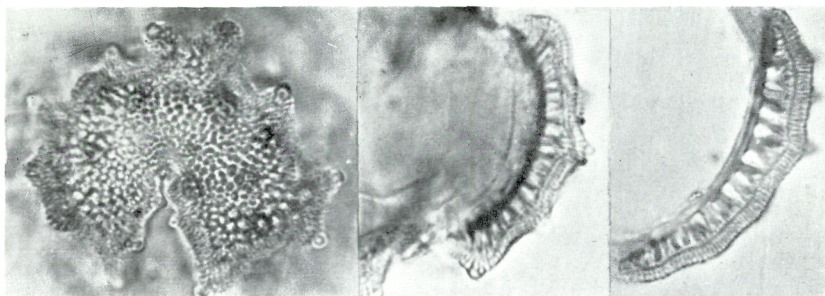
1. *Tanacetum vulgare* L. helt pollen i høj indstilling, 1000 x.
2. " " " " " " " optisk tværsnit 1000 x.
3. " " " " " " " , snit 3 μ . 1000 x.
4. *Saussurea alpina* (L.) D. C. helt pollen i høj indstilling, 1000 x.
5. " " " " " " " " " optisk tværsnit 1000 x.
6. " " " " " " " , snit 3 μ . 1000 x.
7. *Scabiosa columbaria* L., snit 3 μ . 1000 x.



1

2

3

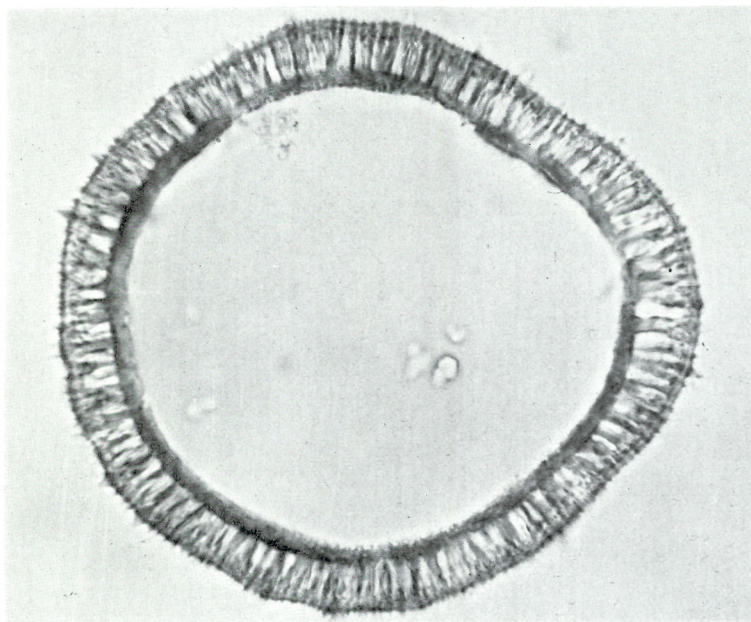


4

5

6

J. TROELS-SMITH fot.



7

B. B. C. fot.