

BİTKİ DOKULARININ MASERASYONU VE BOYAMA TEKNİĞİ

Maceration of plant tissues and improvements on staining
isolated cells

Prof. Dr. BAKİ KASAPLIGİL

(Biology Department, Mills College Oakland, California)

Histolojik araştırmalarda, genel olarak bitki organlarının enine, boyuna, tegetsel veya paradermal kesitleri hazırlanmaktadır. Mikrotom veya basit el kesitlerinde dokular ve hücreler bir düzeyde kolayca incelenebilmekteyse de maalesef derinlik boyutunu kavramakta güçlüklerle karşılaşmaktadır. Dokuları teşkil eden hücrelerin üç boyutlu olduklarını kavramak ve çeşitli hücreleri her üç boyutta inceleyebilmekte maserasyon (=kotonize) tekniğı çok önemli fakat ihmal edilmiş bir araştırma usulüdür. Maserasyon, dokuların kimyasal veya mekanik yollarla hücrelere parçalanması anlamına gelmektedir. Çok defa, maserasyon yanlış anlaşılmakta ve bu usulle hazırlanan dokuların tanınmaz bir «hücre çorbası» haline geldikleri zannedilmektedir. Dokuların özelliklerine uygun olarak en müsait maserasyon eriyikleri seçildiğı takdirde hücre zarları ve ölçüleri bozulmadan çeşitli hücre tiplerinin morfolojilerini her üç boyutta incelemek mümkündür. Bu maksatla bitki parçalarını odunsu ve otsu dokular olmak üzere iki kısımda mütalâa edeceğiz.

I — *Odunsu dokuların maserasyonu*: Sürekli bitkilerde sekonder ksilem veya odun, trake ve trakeidlerden, lif trakeidleri, bölmeli lif trakeidleri, libriform odun lifleri, bölmeli odun lifleri, odun ve ışın parenkiması, çeşitli idioblast ve salgı hücrelerinden müteşekkildir. Odun elemanlarının evrimsel ve sistematik çalışmalarındaki rolü muhtelif araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (TIPPO 1946; METCALFE ve CHALK 1957; RODRIGUEZ 1957; GREGUSS 1955, 1959; EAMES 1961; KASAPLIGİL 1962, 1964). Odun elemanlarının teşhisteki rolünü gösteren eserler o kadar çoktur ki bu kısa makalede dercetmek mümkün değildir; fakat Türk botanikçilerini yakından ilgilendireceğı düşüncesiyle

IATSENKO-KHOMELEVSKII (1954)'nin Kafkasya mntukasının odunlarının teşhisine ait yayımına meslektaşlarının dikkatini çekerim.

Odunsu dokuların hücre çeperleri lignin maddesini ihtiva etmektedir, fakat ligninleşmeyen bölgeler de mevcuttur ve bu bölgeler basit ve boşluklu geçitleri teşkil etmektedir. Bu geçitlerin hücre çeperinde tertip ve dağılışı, çeşitli geçit tiplerinin yapısal özellikleri ve ölçüleri maserasyon materyalindeki hücre bireylerinde kesin olarak incelenebilmektedir. Trakelerin perforasyon tiplerini araştırmada, hücre ucu açılarının ölçülmesinde kesitlerden ziyade maserasyon materyalinden faydalanılmaktadır (RODRIGUEZ 1957).

Odunsu dokuların maserasyonunda kullanılan eriyikler hücreler arasındaki yapıştırıcı maddeyi teşkil eden orta lameli tahrip etmektedir. Orta lamel pektin ve kalsiyum pektinat bileşimlerini ihtiva eder. Odunsu dokularda orta lamelin tahribi için tavsiye edilen usuller aşağıda gösterilmiştir. Bu eriyiklerden hangisi seçilirse seçilsin, önce odun nümunelerinin kürdan veya kibrit çöpü kalınlığında küçük parçalara bölünmesi, bu parçaların suda kaynatılıp hücre boşluklarındaki ve hücreler arasındaki havanın giderilmesi şarttır. Dokulardaki havanın giderilmesinde vakum tulumbası, su trompu, aspiratör gibi cihazlar faydalıdır.

1) JEFFREY metodu : Odun anatomisti E. C. JEFFREY (1917) nin teklif ettiği maserasyon eriyiği eşit ölçüde karıştırılmış %10 nitrik asit ve %10 kromik asit eriyiklerinden müteşekkildir. JEFFREY eriyiği ceviz, fındık gibi meyvaların sert kabuklarını, abanoz odunu gibi en sert odunsu materyalin maserasyonunu sağlayacak kuvvettedir. Aspiratörden geçmiş odun kıymakları JEFFREY eriyiğini muhtevî küçük bir kavanoza veya tübe konup tübün ağzı kapatılır. Oda ısısında maserasyon iki veya üç günde tamamlanır. Maserasyon eriyiğinin odunsu dokuya nüfuzunu hızlandırmak için materyal 30-40°C de elektrik fırınına konabilir. Bu takdirde maserasyon ekseriya 24-48 saatte tamamlanmış olur. Maserasyon derecesini kontrol etmek için bir parça odun nümunesini asit karışımından çıkarıp bir iğne ile denemelidir. İğne odun parçasının içine zahmetsizce girebiliyorsa ve yüzeye yakın hücreler iğne yordamıyla kolayca birbirinden ayrılıyorsa maserasyon derecesi kıvamında demektir. Materyal eriyikte uzun zaman bırakılırsa bütün hücreler birbirinden ayrılır ve süspension halindeki materyalin yıkanması, boyanması zorluklar yaratır. Masere edilmiş materyalin hiç değilse beş altı defa damıtık suyla bir o kadar defa da %50'lik etil alkolle yıkanması ve asitlerin uzaklaştırılması lâzımdır. Elle işliyen veya elektrikli santrifüj cihazı ile hücreleri

süratle yıkamak mümkündür. Santrifüj tübünün daralan dip kısmında toplanan çökeltinin üst tabakasını nisbeten küçük ve hafif parenkima hücreleri teşkil eder. Yıkama esnasında bu hücrelerin ziyan olmamasına dikkat etmelidir. Maserasyon materyalini ağzı sıkıca kapalı bir tüpte %50'lik etil alkol içinde senelerce muhafaza etmek mümkündür. Bu haldeki materyali öğrenci lâboratuvar çalışmalarında kullanmak için lâm üzerinde bir damla gliserine ekleyip üzerini lâmelle kapamak kâfîdir. Sürekli preparatın hazırlanması ileride anlatılacaktır.

2) HARLOW metodu : W. M. HARLOW (1928) nun tavsiye ettiği klorlama usulüne göre odun kıymıkları önce doymuş klorlu suda iki saat kaynatılır, suyla yıkandıktan sonra %3'lük sodyum sülfid eriyiğinde 90°C. de 15 dakika ısıtılır. SASS (1951) maserasyon tamamlanmaya kadar klorlama ve sülfid banyosunun tekrarlanmasını; ;GRAY (1964) eriyik içindeki materyalin cam boncuklarla çalkanmasını tavsiye etmektedir. Hücreler izole edildikten sonra santrifüjle birkaç defa yıkayıp %50'lik alkolde muhafaza edilir.

3) SCHULTZE metodu : Yine sert ve odunsu dokulara uygulanan bu metotta odun parçaları suda kaynama ve aspirasyondan sonra nitrik asitle dikkatle ısıtılır ve üzerine birkaç parça potasyum klorat kristali ilâve edilir (cf. CHAMBERLAIN 1932, S.: 145-146; MC CLUNG 1939, S.: 174). Materyal çok değilse 50 santimetre küp nitrik aside bir gram potasyum klorat yeter. Asit buharından sakınmak için bu işlemin kapalı bir davlumbazda yapılması emniyetlidir. Dört veya beş dakika sonra odun parçaları beyazlaşınca kısmen masere olmuş materyal, içinde su bulunan bir kap içine boşaltılır ve asit tamamen uzaklaştırılmaya kadar birkaç defa yıkanır.

II — *Otsu organların maserasyonu* : Otsu gövdelerde korteks ve öz parenkiması, kollenkima dokusu, yaprak sapı ve mezofili gibi yumuşak ve nazik dokuları masere etmek yolunda nisbeten zayıf tesirli eriyikler kullanılır.

1) PRIESTLEY metodu : Bu metodun esasları FOSTER (1949, S.: 215-217) tarafından etraflıca gösterilmiştir. Taze veya tesbit edilmiş bitki organlarından alınan bir veya iki milimetre çapındaki parçalar üç kısım %70'lik etil alkol ve bir kısım tuz asidinden ibaret karışıma konur ve aspirasyona tabi tutulur. Tüp içindeki asitli alkol eriyiği tazelenip, 20°C de iki gün veya 30°C de bir gün bırakılır. Materyal damıtık suyla birkaç defa yıkandıktan sonra amonyum oksalatın suda hazırlanmış

%0.5 lik eriyiğine nakledilir ve materyalin tabiatına göre bu eriyikte bir kaç gün bırakılır. Bu esnada orta lâmelin pektinli maddeleri amonyum pektat haline geçerek suda erir ve hücreler çözülmiye başlar. Hücrelerine ayrılmış olan doku dikkatle suyla yıkandıktan sonra %50 lik alkolde muhafaza edilir. Bu metot bilhassa kollenkima dokusunun ve idioblastik taş hücrelerinin diğer dokulardan izole edilmesinde iyi sonuç vermektedir.

2) Hücre çeperinin eritilmesi : Bundan evvelki metotla orta lame- lin eritilmesiyle hücreler izole edilmektedir. MARVIN ve MATZKE (1939) öz parenkima hücrelerinin izolesi için SCHWEITZER eriyiği adıyla anılan kuprammonyumla doğrudan doğruya sellüloz tabiatındaki hücre çeperini eritmişlerdir. Güç olduğu kadar sıhhatli ve iyi netice veren bu usulde önce bitkisel doku alkol ve ksilen serisinden geçirilmekte ve sonra yavaş yavaş Montan mumu ile tahnit edilmektedir. Böylece parenkima dokusu mumla doymuş hale gelince SCHWEITZER eriyiğine daldırılmaktadır. Bu eriyik, bakır talaşını amonyum hidroksite daldır- makla elde edilir. Kimyasal terkibi kuprik amonyum hidroksittir. Sellü- löz bu eriyikle yapışkan bir sıvı haline gelmekte ve hücre çeperi açık maviye boyanmaktadır. MARVIN ve MATZKE mumla tahnit edilmiş ve çeperleri kısmen erimiş hücreleri mikroskop altında mikromanipülatörle ayırıp hücrelerin tabiata uygun modellerini hazırlamışlar ve bu modeller üzerinde hücre şeklini, yüzey ve kenarlarını araştırmışlardır.

Masere edilmiş dokularda hücre çeperlerinin boyanması : Genel ola- rak asit boyalar ligninleşmiş hücre çeperleri için ve alkali boyalar ise ligninleşmemiş çeperler için tavsiye edilmektedir (SASS 1951, S.: 60). Fakat hücre çeperlerinin boyanması bu kadar basit bir iş değildir. Me- selâ CHAMBERLAIN (1932) in masere edilmiş olan hücrelerinin lig- ninleşmiş çeperleri için tavsiye ettiği alkali tabiattaki metihyl green bo- yasından iyi bir sonuç alamadım. Buna mukabil alkali bir boya olan bis- mark brown iyi sonuç vermiştir. *Corylus rostrata Ait. var. californica DC.* (= Kalifornia fıındığı) ve *Umbellularia californica Nutt.* (= Kalifornia defnesi) gövde odunlarından JEFFREY metodu ile masere ettiğim lig- ninleşmiş hücreleri santrifüjle alkol ve ksilen serisinden geçirerek çeşitli anilin boyaları ve lignin ayıraçları ile muamele ettim. Boya ve ayıraç yoğunluklarını, kullanılan eritici ortamları ve elde edilen sonuçları aşağıdaki cetvelde özetliyorum :

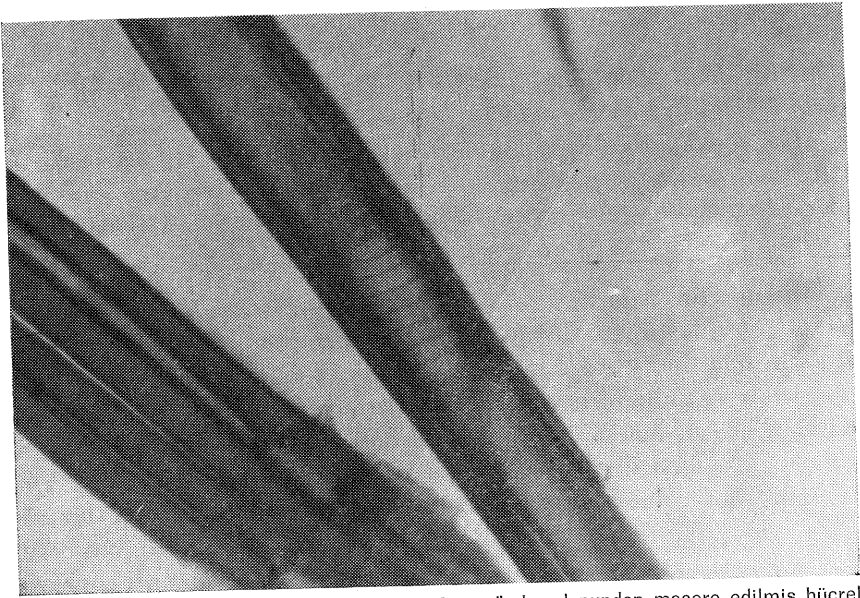
Boya ve ayrıraçlar	Yoğunluk	Eritici	Sonuç ve düşünceler
Acid fuchsin	%1	%95 alkol	Hücre çeperleri açık mor, totomikrografi için uygun.
Basic fuchsin	%5	%95 alkol	Odun lifleri koyu mor, odun ve ışın parenkima hücreleri boyanmadı, mikroskop çalışması için uygun değil.
Iodine green	%1	%70 alkol	Hücreler hiç iyi boyanmadı.
Orange G.	%1	%95 alkol	Açık sarı, iyi boyanmadı.
Methyl green	%0.6	%95 alkol	Lifler açık yeşil, fakat parenkima hücreleri boyanmadı.
Safranin 0	%1	%95 alkol	Bütün hücreler mutedil derecede kırmızıya boyandı, çeper özellikleri çok iyi, fotomikrografi için uygun.
Bismark brown	%0.5	1:1 (*) alkol-ksilen	Bütün hücreler bir kararda açık kahverengi veya koyu sarıya boyandı, mikroskop çalışması için pek iyi.
Crystal violet	%0.5	1:1 alkol-ksilen	Lifler çok koyu mor, mikroskop çalışması için uygun, fakat fotomikrografi için yetersiz.
Methylene blue	%0.5	1:1 alkol ve ksilen	Lifler mavimsi yeşil, trakeler ve parenkima açık mavi.
Safranin 0	%1	1:1 alkol ve ksilen	Bütün hücreler kırmızı, çok iyi ayırtı, fotomikrografi için uygun.
Phloroglucinol	Doymuş	%18 tuz asidi	Hiç reaksiyon göstermedi.
Sulfamethoxazole	%1	%10 limon asidi	Hiç reaksiyon göstermedi.
Sulfadiazine	%1	%10 limon asidi	Hiç reaksiyon göstermedi.
Sulfamethoxazole	%1	%50 tuz asidi	Hiç reaksiyon göstermedi.
Sulfadiazine	%1	%50 tuz asidi	Hiç reaksiyon göstermedi.

(*) Absolü alkol ve saf ksilenin eşit oranlı karışımı.

Bu cetvelden anlaşıldığı gibi ligninleşmiş hücre çeperleri için en iyi sonucu veren asit boyalar acid fuchsin (Şekil 1) ve safranin 0 (Şekil 3) dur. Alkali boyalardan en iyi sonucu veren de bismark brown (Şekil 2) dir. Bu deneylerde takip edilen metot ve araştırma materyaline göre ikinci derecede faydalı gördüğüm boyalar alkali tabiattaki crystal violet (= gentian violet) ve methylen blue'dur.

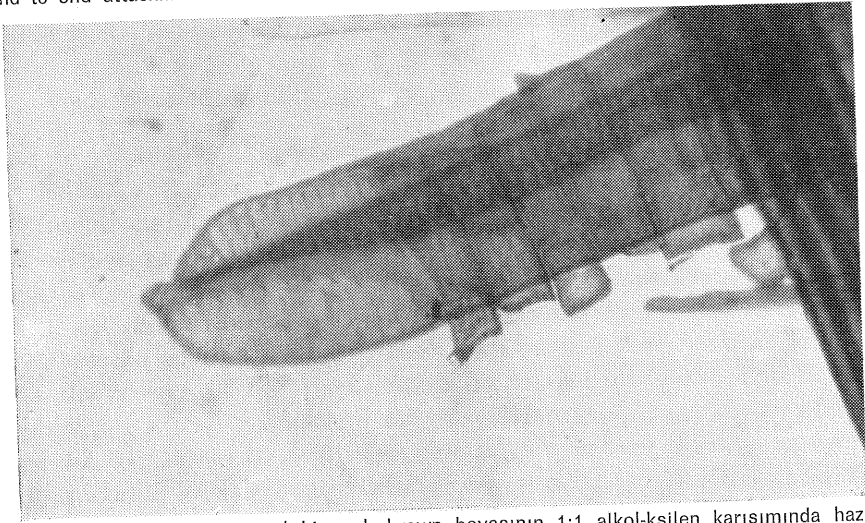
Sulfamitlerin odunsu dokuların kesitlerini boyamakta kullanılması TANYOLAÇ (1949) tarafından etraflıca araştırılmış bulunuyor. Gerçekten, Kalifornia fıncığı ve Kalifornia defnesinin taze odun kesitleri sulfamethoxazole ve sulfadiazine ile karakteristik renk reaksiyonları gösterdi. Sulfadiazine'le muamele edilen kesitler koyu sarıya ve sulfamethoxazole ile muamele edilen ligninleşmiş dokular koyu turuncuya boyandı. Yine aynı materyalden hazırlanan kesitler phloroglucinol'ün %18 lik tuz asidinde doymuş derecede eritilmesiyle elde edilen ayıraçla yıkanınca odunsu dokular koyu kırmızıya boyandı. Adı geçen bu ayıraçların taze hazırlanmış eriyikleri renksizdir, fakat ligninle karşılaşınca her bir ayıraca has karakteristik renk reaksiyonu meydana gelmektedir. Buna mukabil, gerek klâsik lignin ayıracağı phloroglucinol gerekse sulfamitler JEFFREY metodu ile masere edilmiş odun hücrelerinde hiç bir renk değişikliği meydana getimmedi. Lignin maddesinin karbonhidrat grubuna dahil olmadığı bilinmekte ise de çok kompleks kimyasal yapısı henüz kesinlikle bilinmemektedir (JENSEN 1962). JEFFREY eriyiğiyle maserasyondan sonra odun hücrelerinin lignin ayıraçları ile hiç bir reaksiyon göstermemeleri lignin kimyasal yapısında meydana gelen değişikliklere atfedilebilir.

Odunlaşmamış, sellüloz çeperlern boyanmasında iyi sonuç veren boyalar : Acid fuchsin, anilin blue, bismark brown, fast green ve hematoxylin boyalarıdır. FOSTER (1934) in meristem dokularının hücre çeperleri için tavsiye ettiği tannik asit ve ferri klorür metodu masere edilmiş olgun parenkima hücrelerinin çeperlerini de boyamanın derecesine göre gri, mavi veya karaya çalan koyu maviye boyamaktadır. Bu maksatla fıncık ve defnenin genç dallarından soyulan korteks parenkiması PRIESTLEY eriyiği ile masere edildikten sonra %1 lik tannik asit eriyiğinde mordanlaştırılmıştır. Hücreler bu eriyikte on dakika bırakıldıktan sonra santrifüj yordamıyla damıtık suda iyice yıkanarak %3 lük ferri klorür eriyiğine nakledilmiş ve burada birkaç dakika bırakılmıştır. Boyama derecesinin yetersizliği halinde hücreler suyla yıkayıp tekrar mordan eriyiğinden geçirilmiş ve yıkandıktan sonra yine ferri klorüre nakledilmiştir. Böylece arzu edilen farklılaşma derecesi meydana gelinceye kadar metot tekrarlanmıştır. FOSTER metodu çeşitli araştırmacılar



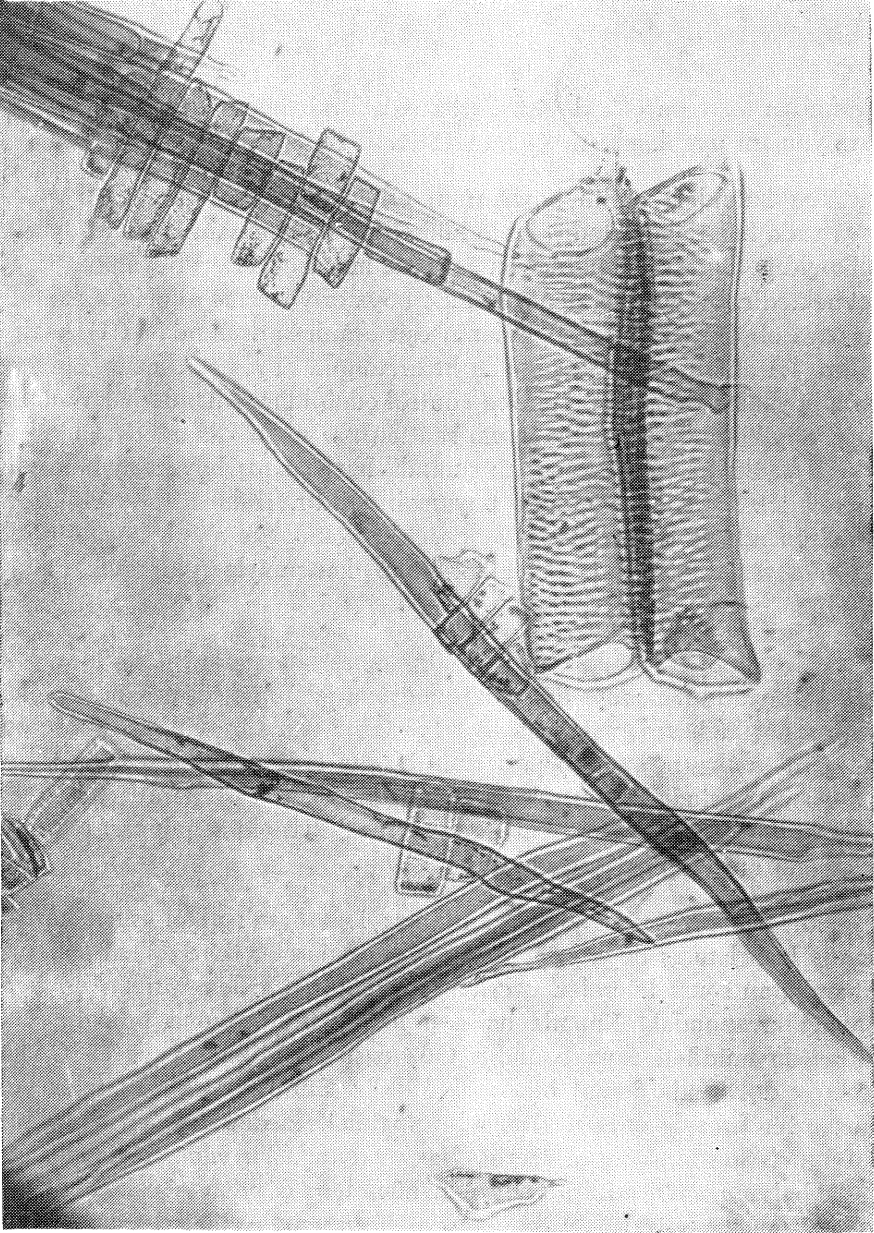
Şekil 1 — *Corylus rostrata* var. *californica*'nın gövde odunundan masere edilmiş hücreler acid fuchsin'in %95 lik alkolde hazırlanmış %1 yoğunluğundaki eriyikle boyanmıştır. Resmin ortasında iki trakenin uç-uca birleşimi ve bu trakelere ait merdivensi perforasyonlar görülmektedir. 400 X.

Figure 1 — Macerated stem wood of *Corylus rostrata* var. *californica* stained with 1% solution of acid fuchsin in 95% alcohol, showing the scalariform perforation plates and end to end attachment of two vessel members. 400 X.



Şekil 2 — Aynı materyal bismark brown boyasının 1:1 alkol-ksilen karışımında hazırlanmış %0.5 yoğunluğundaki eriyikle boyanmıştır. Resmin ortasında iki trakenin yanyana birleşimi ve bu trakelere ait meyilli merdivensi perforasyonlar görülmektedir. 400 X.

Figure 2 — The same material as in Fig. 1, stained with 0.5% solution of bismark brown prepared in 1:1 alcohol-xylene, showing the lateral attachment of two vessel members and their sloping scalariform perforation plates. 400 X.



Şekil 3 — *Umbellularia californica* gövde odununun masere edilmiş elemanları safranin 0 boyasının %95 lik alkolde hazırlanmış %1 lik eriyiği ile boyanmıştır. Yanyana iki trakenin basit perforasyonları ve yan çeperlerin basit geçitleri açıkça görülmektedir. Uçları sivrilen, uzun hücreler libriform odun lifleri ve bunlara bitişik dikey dörtgen şeklindeki hücreler ışın parenkimasıdır. 240 X.

Figure 3 — Macerated xylem elements of the stem wood of *Umbellularia californica* stained with 1% solution of safranin 0 in 95% alcohol, showing the simple perforation plates of two vessel members and the simple pitting on their lateral walls. The elongated, tapering cells are the libriform wood fibers which remain attached to rectangular ray parenchyma cells. 240 X.

tarafından az veya çok değiştirilerek çok farklı hücre tiplerine ve preparasyonlara uygulanmıştır (JOHANSEN 1940, S.: 91-93).

Toz halindeki anilin boyalarının eriyikleri genel olarak etil alkol veya suda hazırlanmaktadır. İzole hücrelerin boyanmasında sulu boyalar kullanıldığı takdirde dehidrasyon zarfında hücre çeperleri boyalarını kaybetmektedir. Bu yüzden, deneylerimde boya eriyiklerini ya %95 lik alkolde veya absöü alkol ile saf ksilenin eşit oranlı karışımında (1:1) hazırladım. 1:1 alkol-ksilen karışımında hazırladığım boyalarla hücre çeperlerinin boyanma derecesini kolayca kontrol edebildim. Alkolde hazırlanmış boya eriyiklerinde hücreleri yarım saatten altı saate kadar boyamak gerektiği halde 1:1 alkol-ksilen karışımında hazırlanmış boya eriyiklerinde hücreleri 2-3 dakika müddetle boyamak kâfidir. Hücre çeperi ve boya çeşidinin afinite derecesine göre çeperler çok koyu renge boyanmışsa, boyanın fazlasını sadece 1:1 alkol-ksilen karışımıyla gidermek mümkündür.

Hücreleri, düşük dereceli alkolde (%50) hazırlanmış boya eriyiklerinde boyadıktan sonra doğrudan doğruya jelatin-gliserin içinde geçici preparatlarını hazırlamak kolay ve basit bir usuldür. Fakat bu usulün en büyük mahzuru hücre çeperlerinin boyayı tedricen jelatin-gliserin ortamına vermesindedir. Bu şekilde hazırlanmış geçici preparatlarda lamel kenarlarının parafinle veya birkaç kat tırnak cilâsiyle kapanması jelâtin-gliserinin kuruyup çatlamasını önler.

Sürekli preparatlar şöyle hazırlanır : Eşit oranlı alkol-ksilen karışımında hazırlanmış boya eriyiğinden geçen hücreler iki defa saf ksilenle yıkandıktan sonra hücreler, üzerine bol miktarda ksilen katılmış ve zeytinyağı kıvamındaki Kanada balsamı içinde infiltrasyona bırakılır. Infiltrasyon müddeti ısıya bağlıdır. Oda ısısında 24 saat veya 35°C lik elektrik dolabında 6 saat bırakmak kâfidir. Bundan sonra hücreler yumuşak bir fırçayla veya dar uçlu bir spatül ile zedelenmeden temiz bir lâmin ortasına bırakılır ve üzerine bal kıvamında bir veya iki damla Kanadâ balsamı ilâve edilir. Tamamen hücrelere çözülmemiş dokuları bu esnada temiz ve sivri uçlu iki iğne ile lâm üzerinde dikkatle ayırıp hücreleri Kanada balsamı içinde yaymak lâzımdır. Az hücre ile hazırlanan preparatlar en iyi sonucu vermektedir. Lâmel kapatıldıktan sonra preparatlar bir tepsi içinde yatay olarak birkaç gün kurumaya terkedilir. Nihayet preparatlar etiketlenip preparat kutusuna nakledilir. Geriye kalan, boyanmış materyal fazlasını saf ksilen içinde koyu renkli şişelerde veya karanlık ve serin bir yerde senelerce muhafaza etmek mümkündür.

S U M M A R Y

The present paper reviews various techniques of maceration as applied to woody and herbaceous tissues. The author carried out a series of experiments to find the most suitable stains for the walls of isolated cells. For this purpose, stem woods of *Corylus rostrata* Ait. var. *californica* DC. (= California hazel) and *Umbellularia californica* Nutt. (= California laurel) were macerated in an equal mixture of 10% nitric acid and 10% chromic acid. The macerated materials were washed with distilled water by means of a centrifuge until the acids were removed. Various coal-tar dyes were applied to the macerated materials either during the dehydration process in alcoholic solutions or during the clearing process in an equal mixture of absolute alcohol and pure xylene (see table). The wood elements were stained most satisfactorily in a 1% solution of acid fuchsin (Fig. 1) and 1% safranin O (Fig. 3) both of which were prepared in 95% ethyl alcohol. Basic fuchsin stained the tracheary elements and fibers almost black, while the parenchyma cells hardly received any stain. Alcoholic solutions of iodine green (a basic dye), methyl green (a basic dye) and orange G. (an acid dye) did not stain the wood elements to any appreciable degree. 0.5% solution of bismark brown (basic) in a mixture of equal parts of absolute alcohol and xylene (1:1) gave an excellent staining result (Fig. 2). Likewise, 1% solution of safranin O (acid) in the same solvent produced outstanding staining, even better than any alcoholic solutions of safranin since destaining of the cells could be controlled readily during subsequent stages of the dehydration-clearing series. 0.5% solutions of crystal violet (basic) and methylene blue (basic) in 1:1 alcohol-xylene gave moderately good results although the libriform wood fibers were stained much darker than vessel members and parenchyma cells.

Free hand sections of stem woods treated with saturated solution of phloroglucinol in 18% HCl produced a deep purple color, but the woody tissues macerated in JEFFREY solution did not show any reaction. Some of the sulfa drugs proved to be excellent reagents for lignin. For this purpose, the untreated wood sections were treated either with 10% solution of citric acid or 50% hydrochloric acid, followed by 1% solution of the sulfa drugs. Sulfadiazine produced a yellow color and sulfamethazazole a deep orange. On the other hand, the same woody material did not give any reaction after having been macerated in JEFFREY solution, possibly due to chemical alterations in the structure of lignin.

FOSTER's staining technique with the use of tannic acid and ferric chloride gave excellent result in staining the cellulose walls of the macerated parenchyma cells obtained from the stem cortex of California hazel and laurel. The degree of staining, ranging from gray to dark blue or black, could be controlled by repeated application of the mordant solution, followed by staining with ferric chloride.

LITERATURE

1. CHAMBERLAIN, C. J. 1932. Methods in plant histology. Fifth edit., Univ. Chicago Press, Chicago.
2. EAMES, A. J. 1961. Morphology of the angiosperms. McGraw-Hill Book Co., New York.
3. FOSTER, A. S. 1934. The use of tannic acid and iron chloride for staining cell walls in meristematic tissue. *Stain Technology* 9:91-92.
4. FOSTER, A. S. 1949. Practical plant anatomy. Second edit., D. van Nostrand Co., Inc., New York.
5. GRAY, P. 1964. Handbook of basic microtechnique. Third edit., McGraw-Hill Book Co., New York.
6. GREGUSS, P. 1955. Identification of living gymnosperms on the basis of xyotomy. Akademiai Kiado, Budapest.
7. GREGUSS, 1959. Holz Anatomie der europäischen Laubhölzer und Sträucher. Budapest.
8. HARLOW, W. M. 1928. A chlorination method for macerating woody tissues. *Botanical Gazette* 85:226-227.
9. IATSENKO-KHMELEVSKII, A. A. 1954. Drvesiny Kavkaza (Woods of Caucasus). Akad. Nauk. Armian SSSR, Erevan.
10. JEFFREY, E. C. 1917. The anatomy of woody plants. Univ. Chicago Press, Chicago.
11. JENSEN, W. A. 1962. Botanical histochemistry. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
12. JOHANSEN, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., New York.
13. KASAPLIGİL, B. 1962. An anatomical study of the secondary tissues in roots and stems of *Umbellularia californica* Nutt. and *Laurus nobilis* L. *Madrono* 16 (7):205-224.
14. KASAPLIGİL, B. 1964. A contribution to the histotaxonomy of *Corylus* (Betulaceae). *Adansonia* 4 (1):43-90.
15. MARVIN, J. W. ve E. B. MATZKE 1939. A new method for the construction of three-dimensional cell models. *Amer. Jour. of Botany* 26 (2):101-103.
16. MC CLUNG, C. E. 1939. Handbook of microscopical technique for workers in animal and plant tissues. Paul B. Hoeber, Inc., New York.
17. METCALFE, C. R. ve L. CHALK 1957. Anatomy of the dicotyledons. Clarendon Press, Oxford.
18. RODRIGUEZ, R. L. 1957. Systematic anatomical studies on *Myrrhidendron* and other woody Umbellales. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 29 (2):145-318.
19. SAS, J. E. 1951. Botanical microtechnique. Second edit., Iowa State Coll. Press, Ames, Iowa.
20. TANYOLAÇ, T. 1949. Biyoloji alanında sülfamit ve akridinlerle araştırmalar. Güney Matbaacılık ve Gazetecilik T.A.O., Ankara.
21. TIPPO, O. 1946. The role of wood anatomy in phylogeny. *Amer. Midl. Nat.* 36:362-372.