

HALINA PIĘKOŚ

## ZASTOSOWANIE I ROLA ELEKTRONOWEGO MIKROSKOPU SKANINGOWEGO W BADANIACH BOTANICZNYCH

Jednym z najbardziej rewelacyjnych przyrządów, jaki w ciągu ostatnich 10 lat technika oddała na usługi biologii i medycyny, jest elektronowy mikroskop skaningowy (SEM). O roli jaką mikroskop ten spełnia w badaniach przyrodniczych świadczy wielka liczba prac wykonanych przy jego zastosowaniu. Pierwsze prace tego typu ogłosili Boyde i Stewart (1963) oraz Oatley (1966). Obecnie bibliografie prac z zastosowaniem mikroskopu skaningowego dla poszczególnych gatunków roślin i zwierząt liczą już setki pozycji (por. Rossi 1968, Johnson 1969, Wells 1969, 1970). Bogata jest również literatura dotycząca metodyki stosowanej w mikroskopii skaningowej. Należy tutaj wymienić zwłaszcza pionierskie prace Boyde'a i współpracowników (Boyde, Barber 1969, Boyde, Wood 1969). Dużym zainteresowaniem cieszą się specjalnie organizowane sympozja, poświęcone mikroskopii skaningowej. Tak np. w roku 1970 odbyło się międzynarodowe sympozjum w Wielkiej Brytanii, na którym przedyskutowano i poddano ocenie dotychczas uzyskane wyniki oraz rozważono dalsze możliwości zastosowania SEM do badań biologicznych. Rezultatem sympozjum było wydanie pod redakcją Heywooda (1971) książki „Scanning Electron Microscopy. Systematic and Evolutionary Applications”, zawierającej 16 referatów wygłoszonych na sympozjum, duży wykaz literatury oraz świetne fotografie wykonane przy zastosowaniu mikroskopu skaningowego. Wspomniana książka ma charakter podręcznika, z którym każdy biolog interesujący się mikroskopią skaningową winien się zapoznać.

W ramach niniejszego artykułu nie sposób omówić znaczenia SEM dla badań we wszystkich dziedzinach botaniki, w których znajduje on zastosowanie. Dlatego skoncentrowano się na roli mikroskopu skaningowego jako źródła nowych, cennych informacji dla systematyki i biologii ewolucyjnej. Zilustrowano to przykładami odpowiednich prac.

Wartość elektronowego mikroskopu skaningowego dla badań biologicznych polega przede wszystkim na tym, że dzięki niezwykle dużej głębi ostrości daje on plastyczny, jakby trójwymiarowy obraz powierzchni analizowanego obiektu, przy

powiększeniach rzędu 10 do 100 000 $\times$ . Tak szeroki zakres powiększeń pokrywa się zatem z jednej strony z powiększeniami lupki ręcznej, a z drugiej strony z zakresem powiększeń transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Mikroskop skaningowy wypełnia więc skutecznie lukę w zakresie powiększeń, jaka istniała pomiędzy mikroskopem świetlnym a elektronowym mikroskopem transmisyjnym. Podczas gdy SEM ma zdolność rozdzielczą 50—300 Å (tj. 0,005—0,03  $\mu$ ), to mikroskop świetlny ma 0,20  $\mu$ . Dla porównania dodajmy, że zdolność rozdzielcza oka ludzkiego wynosi w optymalnych warunkach ok. 1/10 mm. Ponadto SEM ma 300 razy większą głębię ostrości niż mikroskop świetlny. Postęp jaki przedstawia SEM w stosunku do mikroskopu świetlnego porównuje Heywood do przewagi, jaką ma w wierności odtwarzania głosu adapter stereofoniczny nad gramofonem. Ryc. 1 i 2 pozwolą porównać obrazy uzyskane przy pomocy konwencjonalnego mikroskopu świetlnego oraz elektronowego mikroskopu skaningowego. Dają one dobre wyobrażenie o głębi ostrości SEM w porównaniu z mikroskopem świetlnym, a w związku z tym o możliwościach jakie daje SEM w badaniach biologicznych. W transmisyjnym mikroskopie elektronowym strumień elektronów przechodzi przez ultracienki preparat, dając obraz struktury przez którą przeszedł. W mikroskopie skaningowym (czyli analizującym) do uzyskania obrazu wykorzystano elektrony wtórne emitowane przez powierzchnię badanego materiału, pod wpływem bombardowania jej wiązką elektronów pierwotnych o średnicy ok. 100 Å. Strumień elektronów pierwotnych wysyłanych przez emitor, po uzyskaniu przyspieszenia w polu elektrycznym, jest zogniskowany na powierzchni badanej próbki przez zespół soczewek elektromagnetycznych. W kolumnie mikroskopu skaningowego znajduje się ponadto zespół cewek lub płytek, które powodują odchylenie (czyli skaning) pierwotnej wiązki elektronów w dwu kierunkach prostopadłych do siebie. Zmiany napięć w cewkach odchyłających, powodują przesuwanie wiązki elektronów kolejno linia po linii po powierzchni badanej próbki. Wiązka elektronów pierwotnych powoduje wybijanie elektronów wtórnych z kolejnych punktów analizowanej powierzchni. Natężenie emitowanych elektronów wtórnych, zmieniające się w zależności od ukształtowania badanej powierzchni, jest następnie przetwarzane przez detektor na sygnały elektryczne. Obraz, który powstaje na ekranie lampy obrazowej przedstawia mikrotopografię powierzchni badanego materiału. Zmiany powiększenia uzyskuje się w sposób ciągły. Do zjawisk fizycznych jakie powstają pod wpływem działania na badaną próbkę wiązki elektronów pierwotnych o dużej energii, należą ponadto — poza wspomnianą już emisją elektronów wtórnych — takie zjawiska jak: odbicie elektronów oraz absorpcja elektronów pierwotnych, przejście elektronów pierwotnych przez cienki preparat, emisja promieniowania rentgenowskiego oraz fluorescencja składników próbki. Wymienione zjawiska wykorzystuje się praktycznie jako różne źródła informacji o badanym przedmiocie. Zaletą mikroskopu skaningowego w porównaniu z transmisyjnym jest to, że przy jego pomocy materiał biologiczny można badać jako całość, bez konieczności robienia przekrojów. Wybitną korzyść techniki skaningowej wiąże się również z tym, że próbkę można oglądać już w kilkanaście minut po przeniesieniu okazu z naturalnego środowiska. Badając ultrastrukturę przy pomocy TEM, w wyniku zastosowanej techniki preparacyjnej często „oglądany obiekt biologiczny jest preparatem arte-

faktów” (Mercer, Birbeck 1970), a dopiero na podstawie tego obrazu „możliwe jest wydedukowanie prawdziwej struktury z mikrofotografii elektronowej artefaktu”. SEM natomiast daje możliwość badania powierzchni próbek bez zmiany ich pierwotnego stanu oraz bez wprowadzenia wtórnych deformacji. Należy tu podkreślić, że SEM i TEM ze względu na różną jakość informacji jakich oba te przyrządy dostarczają oraz ze względu na różny zakres powiększeń nie tylko nie konkurują ze sobą, lecz często uzupełniają się. Dlatego w badaniach stosuje się często oba te mikroskopy. W świetle wyników uzyskanych przy pomocy jednego z nich łatwiej możemy zinterpretować informacje dostarczane przez drugi mikroskop.

W zależności od właściwości biologicznych i wymiarów badanego materiału w mikroskopii skaningowej stosuje się różne techniki preparacyjne. Ogólnie biorąc przygotowanie preparatu do badań przy pomocy SEM obejmuje następujące etapy: utwalenie, odwodnienie, wysuszenie, napylenie. Nie każdy materiał wymaga przejścia przez te wszystkie etapy. Niektóre, łatwe do przygotowania jak np. zarodniki czy ziarna pyłku poddaje się od razu napyłaniu bez żadnego wstępnego przygotowania, inne natomiast wymagają odpowiedniej techniki preparacyjnej celem odwodnienia, utwalenia i osuszenia. Ogólnie biorąc materiał roślinny ze względu na mocne celulozowe ściany komórkowe oraz częstą obecność w nich takich substancji jak lignina, suberyna czy sporopollenina, jest łatwiejszy do badań niż większość materiałów zwierzęcych (wyjąwszy części twarde jak: kości, zęby, pancerzyki itp.).

Do oczyszczenia powierzchni badanej próbki z obcych zanieczyszczeń wystarczy w wypadku okazów suchych strumień czystego powietrza. Do materiałów mokrych stosuje się przepłukiwanie w odpowiednich roztworach, a następnie w wodzie destylowanej. Przy silnie przylegających zanieczyszczeniach działa się falami ultradźwiękowymi. W mikroskopii skaningowej stosuje się w zależności od badanego materiału szereg różnych utwalaczy oraz różny czas utwalania. Dokładne przepisy sporządzania utwalaczy oraz opis sposobów ich stosowania można znaleźć w podstawowych podręcznikach mikroskopii elektronowej. Ponieważ próbki badane w SEM muszą być w stanie odwodnionym, a materiał biologiczny jak wiadomo zawiera w swym składzie duży procent wody, przeto jedną z ważnych czynności w przygotowaniu preparatu jest jego odwodnienie. Trudność odwodnienia materiału biologicznego bez uszkodzenia jego struktury była jedną z przeszkód szerokiego zastosowania SEM do badań. Dlatego wymienione na wstępie prace Boyde'a i współpracowników o szybkiej i skutecznej metodzie odwadniania tkanek oraz Echlina (1968, 1971) o technice przygotowania nietrwałego materiału biologicznego do badań, odegrały przełomową rolę w rozwoju mikroskopii skaningowej i otwały nowe możliwości zastosowania SEM w biologii i medycynie. W jednej z metod, celem odwodnienia przeprowadza się preparat kolejno przez roztwory alkoholu etylowego lub acetonu o coraz to wyższych stężeniach. Inną metodą odwadniania jest zamrożenie tkanki i usunięcie wody przez sublimację w warunkach wysokiej próżni. Ważnym etapem przygotowania materiału do badań w SEM jest napylenie. Przed napyleniem preparat przykleja się na mosiężne krążki pastą z koloidalnego srebra. Napyła się najczęściej węglem i złotem lub złotem i palladem. Przeprowadza się je w napylarce, w próżni

rzędu  $1 \times 10^{-5}$  tora, przy ustawieniu preparatu pod kątem  $45^\circ$  w stosunku do elektrod.

W badaniach przy zastosowaniu mikroskopii elektronowej istotną rolę odgrywa fotografia. Podczas gdy wykonanie dobrych mikrografii spod mikroskopu świetlnego jest technicznie trudne i czasochłonne, to w przypadku skaningowego mikroskopu elektronowego fotografie badanych próbek (tzw. elektronogramy) otrzymuje się stosunkowo łatwo i szybko. Elektronogramy sprawiając wrażenie trójwymiarowych i ujawniając nieoczekiwane bogactwo szczegółów powierzchni badanych próbek biologicznych, są często tak atrakcyjne i efektowne, że dają badaczowi dużą satysfakcję estetyczną. Tutaj tkwi niebezpieczeństwo produkowania elektronogramów jako „celu samego w sobie”, a nie jako formy informacji naukowej.

Przy pomocy SEM można w ciągu jednego dnia wyprodukować więcej elektronogramów, niż większość czasopism naukowych może opublikować w ciągu roku (Sylvester-Bradley 1971). W związku z tym zaistniał poważny problem publikowania elektronogramów. Na sympozjum w Reading, Williams zaproponował publikowanie oddzielnych elektronogramów dla poszczególnych gatunków. Dałoby to naukowcom możliwość nabycia jedynie tych elektronogramów, które ich interesują, bez nabywania całego czasopisma. Taką formę publikacji próbowano już zastosować wydając atlas *Ostracoda*.

Dzięki zastosowaniu SEM po raz pierwszy w badaniach mikroskopowych uzyskaliśmy możliwość oglądania powierzchni obiektów biologicznych w ich właściwych przestrzennych związkach. Nie jesteśmy jeszcze przyzwyczajeni do oglądania tego typu obrazów. Nasza dotychczasowa wiedza o mikrotopografii powierzchni próbek biologicznych jest ograniczona i była dotąd odbierana tylko w zniekształconej formie obrazów przekazanych nam przez mikroskop świetlny. Często nie mamy jeszcze odpowiedniej terminologii potrzebnej do opisu mikrostruktur ujawnionych przez SEM. Mikroskop skaningowy poszerzył wybitnie zakres cech dotyczących mikrostruktury, stwarzając zarazem problem ich interpretacji i oceny ich wartości oraz ich ewentualnego wykorzystania dla systematyki i biologii ewolucyjnej. Na te aspekty zwraca uwagę Heywood (1971).

Elektronogramy stają się dziś ważną formą ilustracji w pracach taksonomicznych. Mikroskop skaningowy ujawnił złożoność pozornie prostych struktur. Pozwoli to wzbogacić konwencjonalne opisy np. owoców czy nasion. Nowe cechy mikromorfologiczne mogą pomóc m. in. przy identyfikacji nasion roślin ważnych z ekonomicznego punktu widzenia. Wiele cech skulptury powierzchni należy do cech taksonomicznie ważnych. Są to często cechy diagnostyczne. Dlatego informacja poszerzona przy zastosowaniu SEM, pomaga nam niejednokrotnie w rozwiązaniu taksonomicznych problemów, poprzez potwierdzenie, zmodyfikowanie lub odrzucenie dotychczasowych klasyfikacji. Często SEM poza dostarczeniem całkiem nowych informacji pomaga nam w reinterpretacji struktur, które były rozpoznane już wcześniej przy użyciu mikroskopu świetlnego. SEM powinien odegrać ważną rolę przy identyfikacji materiałów kopalnych, zwłaszcza kiedy są one bardzo fragmentaryczne lub kiedy mamy do dyspozycji mało materiału. W takiej sytuacji dodatkowe cechy dostrzeżone przy pomocy SEM zwiększą szansę poprawnej identyfikacji. Dane uzyskane

dzięki SEM pomogą nam niejednokrotnie w zrozumieniu mechanizmów ewolucyjnych, jakie działały w danej grupie roślin. Poniżej podano przykłady możliwości zastosowania SEM w badaniach botanicznych.

Przykładem interesujących badań przy zastosowaniu mikroskopu skaningowego są prace Heywooda i współpracowników (1968, 1971). Owocki *Umbelliferae* — *Caucalideae* studiowane przez tego autora ujawniły ogromną złożoność pozornie prostych struktur. Cechy budowy zewnętrznej owoców były w tej grupie już poprzednio używane jako kryterium przy rozróżnianiu rodzajów. Dzięki zastosowaniu SEM znaleziono dobre dodatkowe cechy w skulpturze owoców *Torilis*, *Turgenia* i *Caucalis*, które to rodzaje nie były dotąd całkiem jasno oddzielone. SEM ujawnił ponadto w rodzaju *Chaetosciadium* obecność na owocach szczecinek o bardzo specyficznej budowie. Rodzaj ten umieszcza się blisko *Torilis* na podstawie wielu innych przebadanych cech. Tak więc w tym przypadku nie wydaje się wskazane, by specyficzną budowę szczecinek uważać za dowód braku pokrewieństwa. Natomiast powstaje interesujący problem w jaki sposób ewoluowały te dwa typy skulptury.

SEM odgrywa także ważną rolę w badaniu budowy i rozwoju kolców u kaktusów. Przykładem mogą tu być studia Robinsona (1974) dotyczące podrodziny *Opuntioideae* przy zastosowaniu SEM, mające konsekwencje taksonomiczne.

Boulter (1971) badał kutikulę liści u współczesnych i kopalnych *Coniferae*. Kutikula dostarcza ważnych cech diagnostycznych. Ponieważ wiele kopalnych szczątków zachowało się w postaci wegetatywnych organów, kutikula ma duże znaczenie w badaniach paleobotanicznych. SEM dostarczył dalszych nowych informacji o strukturze kutikuli cennych dla paleobotaniki. Na elektronogramach można łatwo pomierzyć niektóre elementy, jak np. pory. Cechy kutikuli mają znaczenie nie tylko dla identyfikacji kopalnych rodzajów i gatunków, ale dają także podstawę dla wniosków filogenetycznych. Bardzo dobre wyniki daje połączenie badań kutikuli przy zastosowaniu SEM oraz mikroskopu świetlnego.

Badania morfologii ziarn pyłku i zarodników mają swoją dobrą tradycję dzięki pracom Erdtman'a i innych. Jedną z przyczyn, dla których szczegółowa informacja o tych obiektach jest bardzo potrzebna jest to, że w studiach czwartorzędowych identyfikację materiału kopalnego opiera się często wyłącznie na nich. Studia porównawcze ziarn pyłku współczesnych i mezozoicznych *Gymnospermae* przy zastosowaniu SEM miały duże konsekwencje dla taksonomii i interpretacji filogenetycznych (Reyre 1971). Zastosowanie SEM w palinologii omawia szerzej w swym artykule Stuchlik (1971).

Przy pomocy mikroskopu skaningowego prowadzi się ostatnio intensywne badania nad paprociami. Cechy w skulpturze zarodników ujawnione przez SEM wydają się mieć duże znaczenie taksonomiczne w tej grupie roślin. Tak np. Crabbe, Jermey, Walker (1970) i Piękoś (1975) zastosowali mikroskop skaningowy do badań morfologii zarodników europejskich gatunków z grupy *Dryopteris spinulosa*, a Britton (1972) do amerykańskich przedstawicieli rodzaju *Dryopteris*.

Szczególnie wdzięcznym materiałem dla studiów w SEM są okrzemki oraz inne glony o twardych zmineralizowanych pancerzykach. Ich elektronogramy należą do wyjątkowo pięknych i atrakcyjnych, a dotychczasowe wyniki mają dużą wartość

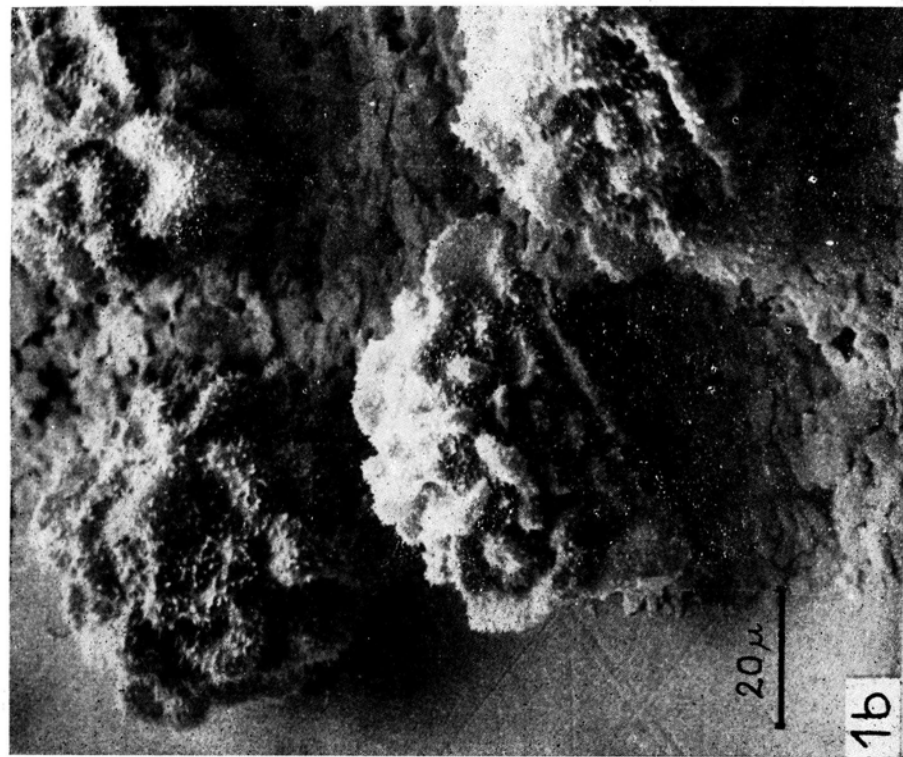
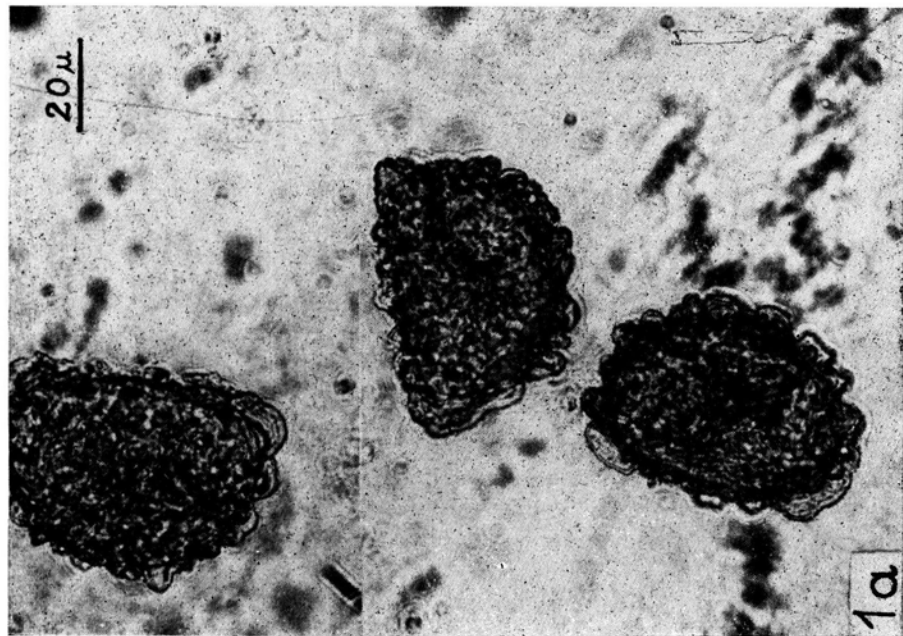
dla systematyki w tych grupach roślin. Tak np. badania nad *Biddulphiaceae* (Ross, Sims 1971) przy zastosowaniu SEM, sugerują konieczność rewizji granic poszczególnych rodzajów w obrębie tej rodziny. Dzięki mikroskopowi skaningowemu opisano nowe gatunki z rodzaju *Campylodiscus* (Jerkovič 1971). SEM pozwolił także wyjaśnić sposoby łączenia się okrzemek w kolonie (Gasse 1970).

Ten nowy mikroskop zastosowano także z powodzeniem w badaniach nad różnymi grupami grzybów (Hawker 1971, Heim, Perreau 1971). Ze względu na delikatną strukturę grzybni większości grzybów, do studiów w SEM najlepiej nadają się zarodniki. Szczegóły ich budowy są jedną z ważnych cech w niektórych grupach grzybów. Przy zastosowaniu SEM badano również rozwój zarodników. Ellis i Heseltine (1969) zademonstrowali przy pomocy mikroskopu skaningowego różnice gatunkowe w ornamentacji konidiów w rodzaju *Aspergillus*. SEM wykorzystano także do badania chlamydozpor i teleozpor tak ważnej ekonomicznie grupy grzybów jaką są *Ustilaginales* (Banerjee i in. 1969).

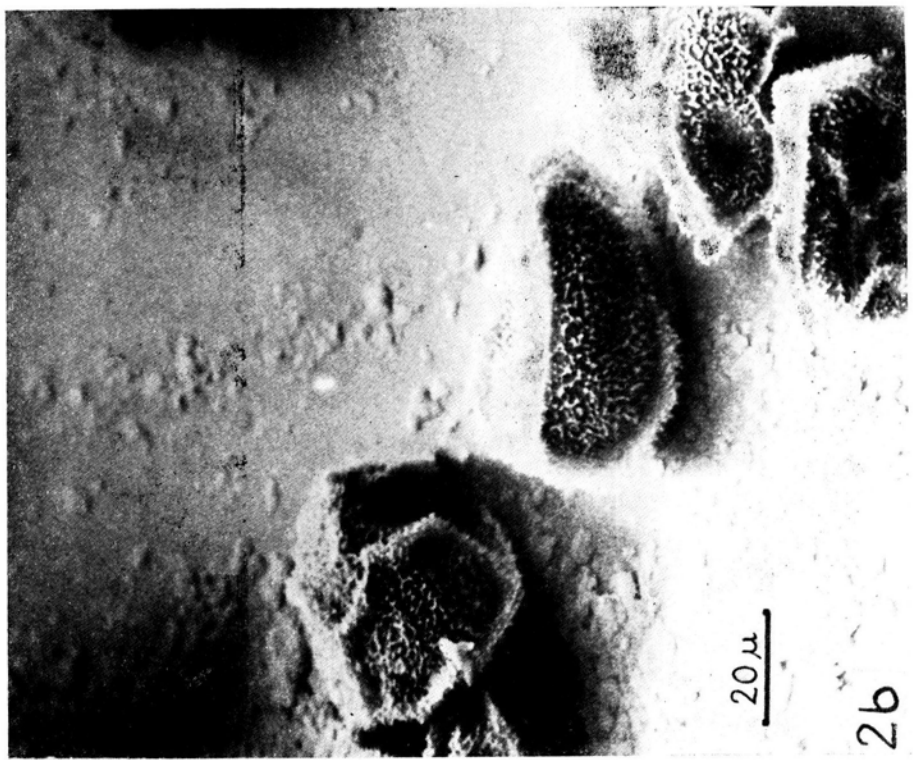
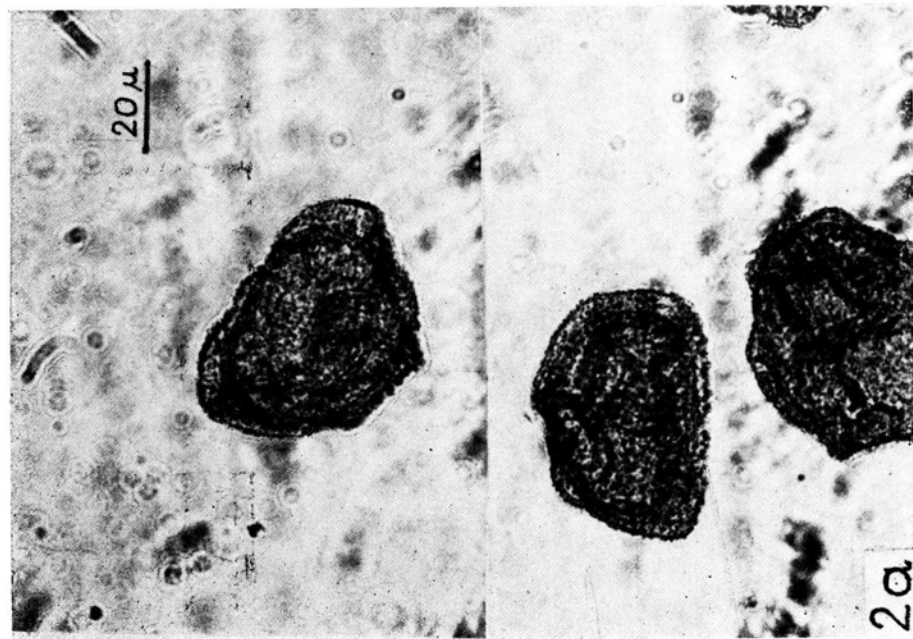
SEM dał także bardzo interesujące wyniki w badaniach grzybów kopalnych (Alvin 1971). Jest to ważne z tego względu, że wiedza o tej grupie roślin jest jak dotąd bardzo skromna. Warto też wspomnieć o zastosowaniu mikroskopu skaningowego do badań bakterii, np. *Actinomycetales*, które są szczególnie trudne do badań przy użyciu innych technik. Obserwacje pod mikroskopem świetlnym doprowadziły w niektórych przypadkach do opisanie w tej grupie mikroorganizmów nowych rodzajów na podstawie artefaktów. SEM dał dobre wyniki w studiach taksonomii, morfogenezy i ekologii *Actinomycetales* oraz okazał się dużą pomocą przy ich identyfikacji (Williams, Davies 1967, Williams, Veltkamp 1971).

SEM pozwala na lepszą jakościową i ilościową analizę kopalnego nannoplanktonu Ramsay (1971). W mikroskopie skaningowym można przeglądać w stosunkowo krótkim czasie liczne próbki i w związku z tym zarejestrować gatunki bardzo rzadkie.

Mikroskop skaningowy zdobywa sobie dziś na świecie rolę zwykłego narzędzia w badaniach biologicznych. Polska, jeśli idzie o stosowanie techniki skaningowej stoi w większości dziedzin biologicznych niestety daleko w tyle. Pierwsze polskie prace przy zastosowaniu SEM dotyczyły medycyny. W tej dziedzinie można stwierdzić stosunkowo dobry rozwój badań w naszym kraju. Wyrazem tego może być sympozjum Sekcji Mikroskopii Elektronowej Polskiego Towarzystwa Anatomopatologów. Sympozjum odbyło się w Białowieży w dniach 24—25 maja 1974. Przedstawiono tu prace z zakresu medycyny oraz jedną tylko pracę z dziedziny zoologii przy zastosowaniu SEM. [Po oddaniu niniejszego artykułu do druku odbyły się 2 następne Konferencje Mikroskopii Elektronowej, w Warszawie (21. X. 1974 r.) i w Gdańsku (24—26. X. 1974 r.), na których zaprezentowano kilka prac z zoologii oraz 1 pracę z botaniki przy zastosowaniu SEM]. W polskiej literaturze botanicznej brak dotąd publikacji elektronogramów wykonanych w kraju. Elektronogramy zarodników paproci prezentowane w niniejszym artykule należą do pierwszych tego typu elektronogramów wykonanych w Polsce Piękoś (1975). Wykonane zostały w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie, na mikroskopie skaningowym JSM-S1.



Ryc. 1. Zarodniki *Dryopteris cristata* obserwowane w mikroskopie świetlnym (1a) i skaningowym (1b).



Ryc. 2. Zarodniki *Dryopteris dilatata* obserwowane w mikroskopie świetlnym (2a) i skaningowym (2b).



Należy żywić nadzieję, że już w niedalekiej przyszłości elektronowy mikroskop skaningowy stanie się powszechnie używanym narzędziem pracy w badaniach botaników polskich.

Zakład Systematyki Roślin Naczyniowych Instytutu Botaniki PAN w Krakowie

#### LITERATURA

- Alvin K. L., 1971. *The Study of Fossil Epiphyllous Fungi by Scanning Electron Microscopy*. W: Heywood V. H. Scanning Electron Microscopy. Academic Press, London — New York. Str. 297—306.
- Banerjee U. C. i in., 1969. *The transmission and scanning electron microscopy of some smut spores, with special reference to the chlamydozoospores of Tilletia caries (DC) Tul.* XI International Botanical Congress Seattle: Abstracts, p. 8.
- Boulter M. C., 1971. *Fine Details of Some Fossil and Recent Conifer Leaf Cuticles*. W: Heywood V. H. Scanning Electron Microscopy. Academic Press, London — New York. Str. 211—236.
- Boyde A., Barber V. C., 1969. *Freeze drying methods for the scanning electron microscopical study of the protozoan Spirostomum ambiguum and the statocyst of the cephalopod mollusc Loligo vulgaris*. J. Cell. Sci. 4: 223—239.
- Boyde A., Wood C., 1969. *Preparation of animal tissues for surface Scanning electron microscopy*. J. Microsc. 90: 221—249.
- Britton D. M., 1972. *Spore ornamentation in the Dryopteris spinulosa complex*. Can. J. Bot. 50: 1617—1621.
- Britton D. M. 1972. *The spores of Dryopteris clintoniana and its relatives*. Can. J. Bot. 50: 2027—2029.
- Crabbe J. A., Jermy A. C., Walker S. 1970. *The Distribution of Dryopteris assimilis S. Walker in Britain*. Watsonia 8: 3—15.
- Echlin P., 1968. *The use of the scanning reflection electron microscope in the study of plant and microbial material* J. r. Microsc. Soc. 88: 417—418.
- Echlin P., 1971. *Preparation of Labile Biological Material for Examination in the Scanning Electron Microscope*. W: Heywood V. H. Scanning Electron Microscopy. Academic Press, London — New York. Str. 307—315.
- Ellis J. J., Heseltine D. W. 1969. *Surface configuration of spores in the Rhizopus and Aspergillus flavus groups*. XI International Botanical Congress, Seattle: Abstracts, p. 54.
- Hawker L. E., 1971. *Scanning Electron Microscopy of Fungi and its Bearing on Classification*. W: Heywood V. H. Scanning Electron Microscopy. Academic Press, London — New York. Str. 237—250.
- Heim R., Perreau J., 1971. *Etude Ornamentale de Basidiospores au Microscope Electronique à Balayage*. Ibid.: 251—284.
- Heywood V. H., 1968. *Scanning electron microscopy and microcharacters in the fruits of the Umbelliferae — Caucaulideae*. Proc. Linn. Soc. 179: 287—289.
- Heywood V. H., 1971. *The Characteristics of the Scanning Electron Microscope and Their Importance in Biological Studies*. W: Scanning Electron Microscopy. Academic Press, London — New York. Str. 1—16.
- Johnson V., 1969. *Bibliography on the scanning electron microscope*. Proceedings 2nd Annual Scanning Electron Microscopy Symposium: 483—525.
- Kaczmarek F., 1971. *Nowe metody mikroskopii elektronowej w biologii*. Wszechświat 9: 235—239.
- Mercer E. H., Birbeck M. S. C., 1970. *Mikroskopia elektronowa*. PWN, Warszawa. Str. 119.
- Oatley C. W., 1966. *The scanning electron microscope*. Sci. Prog. 54: 483—495.
- Piękoś H., 1975. *The sculpturing of the perispore of Dryopteris cristata and in the Dryopteris spinulosa complex in Poland*. Bull. de l'Acad. Pol. Sci.
- Ramsay A. T. S., 1971. *The Study of Lower Tertiary Calcareous Nannoplankton from the North Atlantic Ocean by Means of Scanning Electron Microscopy*. W: Heywood V. H. Scanning Electron Microscopy. Academic Press, London — New York. Str. 179—210.
- Reyre Y., 1971. *Interpretation Botanique des Pollens Inaperturés du Mesozoïque Saharien*. Ibid.: 145—154.
- Robinson H., 1974. *Scanning electron microscope studies of the spines and glochids of the Opuntioideae (Cactaceae)*. Amer. J. Bot. 61/3/: 278—283.

- Ross R., Sims P. A., 1971. *Generic Limits in the Biddulphiaceae As Indicated by Scanning Electron Microscope*. W: Heywood V. H. *Scanning Electron Microscopy*. Academic Press, London — New York. Str. 155—178.
- Stuchlik L., 1971. Zastosowanie nowych technik mikroskopowych w palinologii. *Wiad. Bot.* 15 (2): 131—138.
- Williams S. T., Davies F. L., 1967. *Use of a scanning electron microscope for the examination of Actinomycetes*. *J. gen. Microbiol.* 48: 171—177.
- Williams S. T., Veltkamp C. J., 1971. *The Value of Scanning Electron Microscopy for the Examination of Actinomycetes*. W: Heywood V. H. *Scanning Electron Microscopy*. Academic Press, London — New York. Str. 285—296.