

TADEUSZ BOCHNIA, ANNA HOMIŃSKA

ZASTOSOWANIE MIKROSONDY ELEKTRONOWEJ W BADANIACH FIZJOLOGII KOMÓRKI ROŚLINNEJ

THE USE OF X-RAY MICROPROBE IN THE RESEARCH OF PLANT CELL PHYSIOLOGY

Skład elementarny materiału roślinnego może być analizowany przy zastosowaniu zarówno metod jakościowych jak i ilościowych. Rodzaj stosowanej metody uzależniony jest od badanego procesu fizjologicznego oraz identyfikowanego pierwiastka. Analityka cytochemiczna wykorzystuje metody fluorymetryczne do określania pierwiastków, które tworzą z określonymi substancjami fluoryzujące związki kompleksowe. Za pomocą tej metody określić można np. obecność Ca^{2+} , stosując chlorotetracyklinę [27], a powstały kompleks analizuje się w mikroskopie fluorescencyjnym. Często wykorzystywaną metodą w oznaczaniu Ca^{2+} i Mg^{2+} jest tworzenie strąków z KPA [5, 12], a następnie przeprowadzanie ich lokalizacji na preparatach w TME. Inne pierwiastki oznacza się na preparatach w mikroskopie świetlnym, stosując typowe reakcje znane z chemii analitycznej.

Często jednak informacje uzyskane na tej drodze, aczkolwiek bardzo ważne, nie są wystarczające do interpretacji mechanizmu różnych procesów fizjologicznych. Konieczne wówczas staje się ilościowe oznaczenie pierwiastków. Metody stosowane przy tego typu preparatyce są bardziej złożone i wymagają ponadto skomplikowanej aparatury. Precyzyjne oznaczenie kilku pierwiastków w jednorodnym materiale roślinnym może być dokonane za pomocą zastosowania atomowej spektroskopii absorbcyjnej. Podobne wyniki można również uzyskać stosując odpowiedniej mocy wiązkę laserową, która doprowadza do odparowania z badanej próbki większości pierwiastków, których skład i koncentrację w powstałych parach analizuje się stosując metody fotometrii emisyjnej, absorpcyjnej względnie spektroskopii masowej.

Wyszczególnione metody, aczkolwiek bardzo precyzyjne, pozwalają uzyskać informację o globalnej koncentracji danego pierwiastka w badanej próbce. Jedyłą

Wykaz stosowanych skrótów: **MET** — mikroskop elektronowy transmisyjny, **MES** — mikroskop elektronowy skaningowy, **KPA** — piroantymonian potasu, **Pr** — forma fitochromu absorbująca światło czerwone, **Pfr** — forma fitochromu absorbująca światło podczerwone.

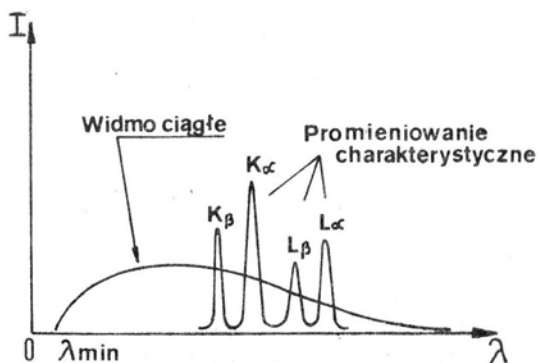
jak dotąd metodą, za pomocą której możliwe jest oznaczenie pierwiastków w mikroobszarach komórki np. w ścianie komórkowej, cytoplaźmie, wakuoli i innych organelach jest metoda mikrosondy elektronowej.

W artykule opisana zostanie zasada działania mikrosondy elektronowej, niektóre techniki przygotowywania materiału roślinnego oraz przykłady jej zastosowania w badaniach fizjologii roślin.

Podstawy teoretyczne

Promieniowanie X, zwane inaczej promieniowaniem rentgenowskim, to fale elektromagnetyczne zajmujące w widmie obszar pomiędzy nadfioletem UV a promieniami gamma (γ). Długość fali promieniowania X zawarta jest w przedziale od 0,01 Å do 100 Å. Promieniowanie rentgenowskie powstaje zawsze w czasie bombardowania próbki strumieniem naładowanych cząstek o odpowiednio wysokich energiach [24], np. podczas bombardowania antykatody w lampie rentgenowskiej elektronami przyśpieszonymi różnicą potencjałów rzędu 10^4 — 10^5 V.

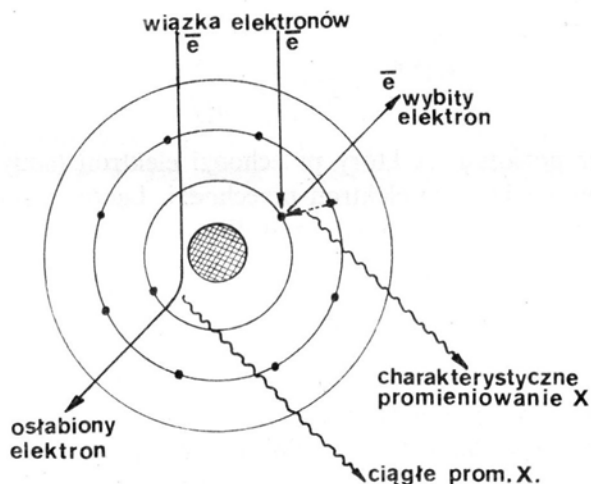
W widmie emisyjnym antykatody można wyróżnić dwojakiemu rodzaju promieniowanie (ryc. 1). Jedno z nich ma widmo ciągle polichromatyczne, w którym



Ryc. 1. Widma charakterystycznego i ciągłego promieniowania rentgenowskiego

rozkład energii nie zależy praktycznie od materiału antykatody. Jest to tzw. promieniowanie hamowania [32, 34]. Drugie, pojawiające się tylko przy dostatecznie dużych energiach bombardujących elektronów, ma widmo liniowe, nakładające się na poprzednie. Jest to tzw. charakterystyczne promieniowanie rentgenowskie [32, 34], ponieważ długości fal promieniowania odpowiadającego poszczególnym liniom widma są inne dla każdego pierwiastka znajdującego się w antykatodzie i w ten sposób charakteryzują jej skład. Promieniowanie hamowania powstaje zawsze, gdy naładowane cząstki tracą swą prędkość w polu elektrostatycznym jąder i otaczających je elektronów. W czasie hamowania cząstek następuje gwałtowna zmiana natężenia pola magnetycznego, której z kolei, zgodnie z teorią Maxwella,

towarzyszy powstanie zmiennego pola elektrycznego. W ten sposób dochodzi do wyemitowania fotonów promieniowania elektromagnetycznego. Znacznie ważniejsze z punktu widzenia analityki jest promieniowanie charakterystyczne, które składa się z niezbyt bogatych w linie serii. Mechanizm powstawania tego promieniowania jest zupełnie inny niż promieniowania ciągłego. Uderzające w próbkę elektrony przekazują swoją energię elektronom z wewnętrznych powłok atomów wchodzących w skład próbki, co z kolei prowadzi do wyemitowania tych elektronów poza atom. Powstała w ten sposób luka w niższej powłoce zostaje zapełniona przez elektron przeskakujący z powłoki o wyższej energii, czemu towarzyszy emisja kwantu promieniowania charakterystycznego, o energii $h\nu$ odpowiadającej różnicy energii tych powłok [19, 25] (ryc. 2). Jeżeli elektron został wybity z powłoki K , to kwanty promieniowania charakterystycznego emitowane przy przeskokach elektronów z wyższych powłok na powłokę K utworzą w widmie linie serii K . Linie te



Ryc. 2. Wzbudzenie charakterystycznego i ciągłego promieniowania X za pomocą wiązki elektronowej — schemat zjawisk zachodzących w atomie

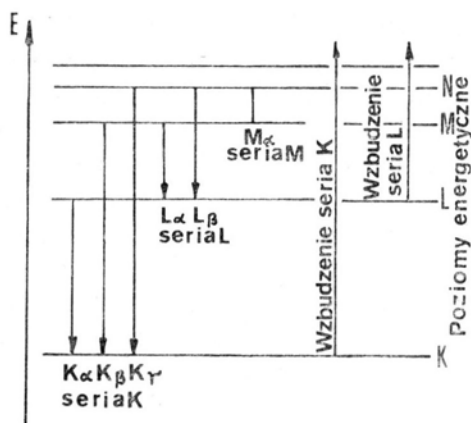
oznaczane są kolejno K_α dla przejścia z powłoki L na powłokę K , K_β dla przejścia z powłoki M na powłokę K itp. Analogicznie powstają serie L (linie $L_\alpha, L_\beta, L_\gamma, \dots$), M (linie $M_\alpha, M_\beta, M_\gamma, \dots$), itp. (ryc. 3).

Związek pomiędzy częstością linii widmowych charakterystycznego promieniowania X a liczbą atomową Z pierwiastka emitującego to promieniowanie podał Moseley [26] w postaci:

$$\sqrt{\nu} = \sqrt{A} \cdot (Z - b) \quad (1)$$

gdzie: A — współczynnik proporcjonalności, b — stała ekranowania, ν — częstość linii widmowej.

Moseley powiązał również stałą A ze stałą Rydberga R oraz z poziomami elektro- nowymi, pomiędzy którymi zachodzi przejście elektronu. Zależność ta przedsta-



Ryc. 3. Schemat wzbudzenia i emisji serii charakterystycznego promieniowania X

wiona jest wzorem:

$$A = R \cdot \left(\frac{1}{n_1^2} - \frac{1}{n_2^2} \right) \quad (2)$$

gdzie: n_1 — numer poziomu na który przechodzi elektron (stały dla danej serii), n_2 — numer poziomu z którego elektron przechodzi. Łącząc wzory 1 i 2 otrzymujemy wzór 3 z którego można obliczyć częstotliwość fali odpowiadającej dowolnej linii widma dla dowolnego pierwiastka:

$$\nu = R \cdot (Z - b)^2 \cdot \left(\frac{1}{n_1^2} - \frac{1}{n_2^2} \right) \quad (3)$$

Stała ekranowania b wyraża oddziaływanie pozostałych elektronów powodujących zmniejszenie efektywnego ładunku jądra. Wzór 3 ma podstawowe znaczenie w jakościowej analizie za pomocą mikrosondy elektronowej [19].

Charakterystyczne promieniowanie rentgenowskie może zostać wzbudzone również strumieniem innych naładowanych cząstek takich jak protony, cząstki α itp., pod warunkiem że ich energia przewyższa energię krawędzi absorpcji fotoelektrycznej, czyli energię wiązania elektronu na danym poziomie w atomie (25). W przypadku zastosowania elektronów, energia krawędzi absorpcji fotoelektrycznej wynosi kilkadziesiąt keV, i jest osiągnąta przez przyspieszanie elektronów w betatronach (jest to podstawą działania mikrosondy elektronowej) [19, 24, 41]. Inny sposób wzbudzenia promieniowania X polega na naświetlaniu próbki promieniowaniem γ lub X . Występuje wówczas zjawisko fluorescencji rentgenowskiej [50].

Wzbudzanie promieniowania charakterystycznego za pomocą elektronów ma tą zaletę, że elektrony można silnie zogniskować, co pozwala na wzbudzenie obszarów próbki o średnicy kilku mikrometrów, a jednocześnie można prowadzić elektroniczną obserwację analizowanego preparatu. Wszystko to sprawia, że mikrosonda elektronowa jest jedną z nielicznych metod analizy elementarnej w mikroobszarach i jest bardzo przydatna w badaniach fizjologii roślin [7].

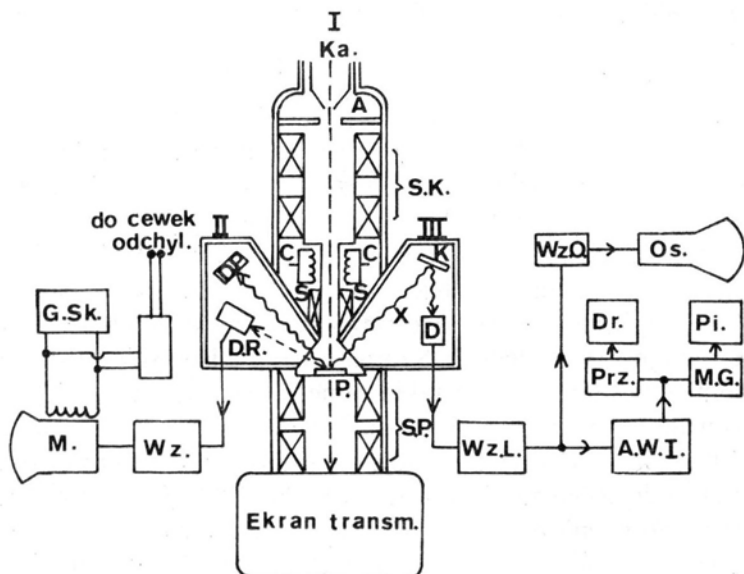
Wybitcie elektronu z n -tej powłoki atomu, czyli jego jonizacja, zachodzi z pewnym prawdopodobieństwem określonym wielkością tzw. przekroju czynnego na jonizację n -tej powłoki (Q_n). Przekrój czynny Q_n wyrażony jest wzorem Bethego [19]:

$$Q_n = b_n \cdot \frac{1}{(E^{abs})^2} \cdot \frac{\ln c_n U}{U} \quad (4)$$

gdzie: b_n , c_n — stałe dla danej powłoki elektronowej, $U = E/E^{abs}$ — napięcie zredukowane, E — energia elektronów padających na próbkę, E^{abs} — energia krawędzi absorpcji fotoelektrycznej.

Budowa i działanie mikros sondy elektronicznej

Ogólne zasady budowy i działania mikros sond elektronicznych produkowanych przez różne firmy są jednakowe, a różnice dotyczą tylko rozwiązań konstrukcyjnych poszczególnych podzespołów mikroanalizatora oraz urządzeń rejestrujących. Schemat budowy podstawowych podzespołów mikros sondy elektronicznej przedstawiony jest na rycinie 4. Jak widać, mikrosonda składa się z trzech głównych



Ryc. 4. Schemat budowy podstawowych podzespołów mikros sondy elektronicznej sprzężonej z mikroskopem skaningowym: I — kolumna elektroniczna, Ka — katoda, A — anoda, S. K. — soczewki magnetyczne kondensora, C — cewki odchyłające, S — minisoczewki, P — stolik próbek, S. P. — magnetyczne soczewki projekcyjne, II — spektrometr EDS, DP — detektor półprzewodnikowy, DR — detektor elektronów rozproszonych, III — spektrometr WDS, X — promieniowanie X, Wz. L. — wzmacniacz liniowy, K — kryształ, D — detektor promieniowania X, A. W. I. — analizator wysokości impulsów, Prz. — przelicznik, Dr — drukarka, M. G. — miernik gęstości impulsów, Pi — pisak, Wz. O. — wzmacniacz oscyloskopu, Os — oscyloskop, Wz — wzmacniacz, M — monitor, G. Sk. — generator skanujący [19, 25]

zespołów: zespołu centralnego (kolumna elektronowa ze stolikiem i komorą próbek, spektrometry rentgenowskie, pulpit sterowniczy oraz układ próżniowy i źródło napięcia), zespołu urządzeń rejestrujących oraz z generatora wysokiego napięcia. Kolumna elektronowa złożona z działa elektronowego, soczewek magnetycznych oraz z odpowiednich przesłon ma za zadanie uformowanie wiązki elektronowej tak, aby jej przekrój w punkcie zetknięcia z preparatem był jak najmniejszy, a jednocześnie aby wiązka miała odpowiednio wysokie natężenie. Kolumna elektronowa może być częścią składową MET lub MES sprzężonych z mikrosondą, co znacznie podnosi walory tej metody analitycznej [35]. Wiązka elektronów pada pod kątem 90° na preparat umieszczony w komorze próbek na specjalnym stoliku. W komorze próbek i w całej kolumnie panuje próżnia rzędu 10^{-3} — 10^{-4} Pa [25]. Z kolumną elektronową połączone są spektrometry rentgenowskie, których zadaniem jest otrzymywanie widm promieniowania emitowanego ze wzbudzonego mikroobszaru próbki. Klasyczna metoda spektrometrii promieniowania rentgenowskiego wykorzystuje zjawisko rozszczepienia wiązki tego promieniowania w czasie odbicia od płaszczyzn sieciowych kryształu. Istnieje związek pomiędzy długością fali λ a kątem θ , przy którym obserwuje się maksimum natężenia interferujących promieni odbitych od płaszczyzn krystalograficznych. Jest to tzw. warunek Braggów [25] wyrażony wzorem:

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad (5)$$

gdzie: n — rząd widma, d — odległość pomiędzy płaszczyznami sieciowymi kryształu (tzw. stała sieciowa).

Klasyczny spektrometr rentgenowski składa się więc z kryształu-monochromatora, kolimatorów oraz z detektora, którego zadaniem jest pomiar natężenia badanego promieniowania. Jako detektory stosuje się przyrządy służące do pomiaru wysokoenergetycznego promieniowania elektromagnetycznego tj. liczniki proporcjonalne, liczniki scyntylicyjne itp. Ten sposób rejestracji widm promieniowania X nosi nazwę metody z dyspersją długości fali WDS (ang. Wavelength Dispersive Spectrometry), a jego zaletą jest duża energetyczna zdolność rozdzielcza rzędu kilku eV [25]. Druga metoda spektrometrii rentgenowskiej polega na dyspersji energii i oznaczana jest symbolem EDS (ang. Energy Dispersive Spectrometry) [30]. Detektory promieniowania są tutaj takie same jak w metodzie WDS, a ostatnio stosuje się również detektory półprzewodnikowe np. ze złączem dyfuzyjnym Li/Si [46]. W metodzie EDS wykorzystuje się liniową zależność pomiędzy energią promieniowania padającego na detektor, a amplitudą sygnału wywołanego w detektorze przez to promieniowanie. Impulsy te zostają wzmocnione i przetworzone na widmo promieniowania w urządzeniach elektronicznych zwanych jedno- lub wielokanałowymi analizatorami amplitudy impulsów. Zaletą tej metody jest możliwość równoczesnej rejestracji całego widma [16], jednak w porównaniu ze spektrografem typu WDS, ma ona o wiele słabszą rozdzielczość. Szczegóły związane z działaniem aparatury pomiarowej stosowanej w EDS zostały opisane przez Lisieckiego [28].

Analiza jakościowa

Podstawą analizy jakościowej jest zależność pomiędzy długością fali charakterystycznego promieniowania X, emitowanego przez dany pierwiastek wchodzący w skład analizowanej próbki, a liczbą atomową tego pierwiastka (wzory 1—3). Technika wykonania analizy jakościowej sprowadza się więc do rejestracji pełnego widma emitowanego promieniowania i przypisania poszczególnym liniom widmowym odpowiadających im długości fal lub energii. Następnie na podstawie specjalnych tablic i katalogów jednoznacznie określa się skład jakościowy próbki poddanej analizie [41].

Analiza ilościowa

Podstawą analizy ilościowej jest proporcjonalna zależność pomiędzy natężeniem linii widmowej promieniowania i -tego pierwiastka a jego zawartością w badanym preparacie. Natężenie promieniowania charakterystycznego, wzbudzonego w cienkiej jednorodnej próbce, można wyrazić wzorem [19]:

$$I_i = K \cdot I_0 \cdot Q_{ni} \cdot \omega_i \cdot C_i \cdot N \cdot \frac{1}{A_i} \rho t \quad (6)$$

gdzie: N — liczba Avogadro, A_i — liczba masowa i -tego pierwiastka, ρ — gęstość próbki, t — grubość próbki, Q_{ni} — przekrój czynny na jonizację n -tej powłoki i -tego pierwiastka (wzór 4), C_i — zawartość i -tego pierwiastka, ω_i — wydajność fluorescencji dla wybranej serii widmowej.

Wzór 6 odnosi się tylko do cienkich próbek, w których strata energii elektronów w czasie przejścia przez próbkę oraz absorpcja wzbudzonego promieniowania X są bardzo małe i można je w obliczeniach pominąć. Próbki cienkie to te, dla których masy powierzchniowe ($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$) są dostatecznie małe w stosunku do obszaru wzbudzenia. Masy powierzchniowe wyznacza się podczas analizowania rozkładu energii w widmie promieniowania hamowania [19, 32, 34]. W przypadku próbek grubych o masie powierzchniowej nasycenia, zależność natężenia promieniowania przestaje być jednoznaczna i liniową funkcją zawartości badanego pierwiastka, co spowodowane jest pojawieniem się różnych efektów przeszkadzających, występujących niezależnie od sposobu detekcji i rodzaju spektrometrii promieniowania X [10]. Wśród tych efektów najważniejszym źródłem błędów jest efekt matrycy, wywołany przez absorpcję i wzmocnienie promieniowania X. Absorpcja polega na osłabieniu promieniowania emitowanego przez oznaczany pierwiastek, w wyniku pochłaniania tego promieniowania przez inne pierwiastki, znajdujące się w próbce. Wzmocnienie polega na dodatkowym wzbudzeniu atomów oznaczanego pierwiastka promieniowaniem X emitowanym przez niektóre pierwiastki towarzyszące. Mikroanaliza rentgenowska jako metoda porównawcza wymaga ponadto stosowania wzorów o składzie chemicznym odpowiadającym analizowanym preparatom. Metody

przygotowania wzorów do analizy materiałów biologicznych zostały opisane m. in. przez Chandlera [6], Roomansa [42] oraz Spurra [45]. Ze względu na efekty przeszkadzające oraz z powodu możliwych różnic w składzie chemicznym wzorca i preparatu, zachodzi konieczność wprowadzenia poprawek zwanych współczynnikami korekcji [37]. Obecnie istnieje kilkanaście sposobów obliczania tych poprawek [33, 34], z których większość została opisana przez Goldsteina i in. [19]. W mikroanalizie rentgenowskiej najczęściej stosuje się tzw. korekcję ZA_bF (ang. Z — atomic number correction, A_b — absorption correction, F — fluorescence correction), w której uwzględnia się efekty wstecznego rozpraszania elektronów i ich spowalnianie w próbce, absorpcję charakterystycznego promieniowania X oraz efekt wtórnej fluorescencji [35]. Dokładniejsze omówienie tej metody wykracza poza ramy tego opracowania. Czytelnik może się z nią zaznajomić w pracy Hołyńskiej i Markowicza [25].

Obecnie teoria i techniki prowadzenia analiz za pomocą mikrosondy elektronicznej ulegają ciąglemu doskonaleniu na skutek postępu w badaniach wzajemnego oddziaływania wiązki elektronicznej z próbką [11] i jej otoczeniem [38], oraz w związku z udoskonalaniem procesu detekcji promieniowania rentgenowskiego.

Techniki preparacji materiału roślinnego do analizy mikrosondą elektroniczną

Przygotowanie materiału roślinnego do badań mikrosondą elektroniczną wymaga stosowania skomplikowanych technik preparacji, które podyktowane są rodzajem stosowanej aparatury oraz typem badanego procesu fizjologicznego. Ogólne techniki preparacji różnią się zasadniczo w przypadku analizowanego materiału mikrosondą sprzężoną z MET i MES. W przypadku sprzężenia mikrosondy elektronicznej z MET stosowana bywa często rutynowa preparatyka materiału identycznie jak do obserwacji w MET. Wielu autorów stosowało różne modyfikacje tej techniki preparacji. W szeregu opracowaniach uwzględniono możliwość wprowadzenia roztworu KPA do utrwalacza [3, 5, 8, 13]. Ta modyfikacja metody pozwala na wiązanie przez KPA dwuwartościowych kationów szczególnie Ca^{2+} i Mg^{2+} i wytworzenie w komórkach strąków. Zezwala ona następnie zarówno na jakościową ocenę rozmieszczenia tych kationów w mikroobszarach komórki, które widoczne są w postaci czarnych złogów jak również na przeprowadzenie ilościowej analizy preparatu mikrosondą elektroniczną [12, 13].

W przypadku badania procesów fizjologicznych, w których następuje szybki transport jonów pomiędzy apoplastem i symplastem, stosuje się metodę utrwalania preparatów połączoną z wymianą wody komórkowej w niskiej temperaturze na niewodne rozpuszczalniki (ang.: freeze substitution) [39, 52]. W tej metodzie bardzo ważne jest utrzymanie warunków bezwodnych we wszystkich etapach preparacji. W przypadku nieprzestrzegania tych warunków może następować migracja substancji rozpuszczalnych z komórek do roztworów wodnych [17, 18]. Naczynka

z preparatami umieszcza się w butli Dewara, zawierającej jako kąpiel chłodząca aceton i suchy lód. Tak przygotowany materiał przetrzymany zostaje w tych warunkach przez okres 2—3 dni, a następnie w ciągu pięciu dni temperatura podnoszona zostaje stopniowo do -48°C . Wielu autorów badając różny materiał roślinny wykazało, że okres ten jest wystarczający do całkowitej wymiany wody tkankowej na rozpuszczalniki bezwodne [18]. Całkowita wymiana wody w tkankach na rozpuszczalniki bezwodne pozwala na podniesienie temperatury do -10°C , w której OsO_4 zostaje wypłukany acetonem. Następnie utrwalona próbka zostaje utrzymana w temperaturze 0°C i infiltrowana odpowiednią żywicą przez okres około 30 godzin. W przypadku tej metody stosowane żywice zostają uprzednio suszone przez okres 3 dni z aktywowanymi sitami molekularnymi.

Utrwalone próbki materiału mogą być zatopione w mieszaninie żywic wg Spurra [44]. Przy zastosowaniu do infiltracji tej żywicy konieczna staje się wymiana dwuepoksydu DER-736 na epon DY-064 celem eliminacji sztucznie podniesionego w próbkach poziomu chloru. Przygotowane jedną z powyżej opisanych technik preparaty poddaje się krojeniu przy użyciu noża diamentowego. Do analiz używa się skrawków cienkich o grubości 150—250 nm [43] lub grubych $1\ \mu\text{m}$ [14]. Do rozprostowywania skrawków stosuje się pary metylocykloheksanu, zamiast konwencjonalnie stosowanych par chloroformu, które podnoszą w preparacie poziom chloru [39]. Otrzymane po krojeniu preparatu skrawki zostają umieszczone na siatkach podtrzymujących uprzednio pokrytych błonkami.

Celem podniesienia przewodnictwa preparatu konieczne jest jego napylenie za pomocą jednej lub kombinacji dwóch, następujących substancji: węgla, złota, aluminium, chromu lub berylu [36]. Ten ostatni pierwiastek jest doskonały do napylenia próbek biologicznych użytych do określenia koncentracji pierwiastków lekkich. Posiada on wysokie przewodnictwo cieplne i elektryczne w 100 K, niższą absorpcję promieni X przez próbkę, w porównaniu z pozostałymi substancjami jak również nie następuje przy jego zastosowaniu emisja wykrywalnego charakterystycznego promieniowania X.

W przypadku analizy materiału roślinnego za pomocą mikros sondy elektronowej sprzężonej z MES najczęściej stosowaną metodą przygotowywania preparatów jest ich zamrożenie bez uprzedniego utrwalenia [53]. Próbki materiału umieszcza się w miedzianych pojemnikach, a następnie zamraża przez zanurzenie w ciekłym azocie. Tak przygotowany materiał poddaje się łupaniu bezpośrednio pod powierzchnią azotu. W ten sposób otrzymuje się żądaną powierzchnię preparatu, wolną od jakichkolwiek zanieczyszczeń. Otrzymany w ten sposób zamrożony preparat umieszczony zostaje na stoliku kriostatu w temperaturze -150°C , która zostaje również utrzymana podczas obserwacji i analizy w MES. Procedura ta minimalizuje przemieszczanie jonów [22], a ponadto daje preparat bez strukturalnych zniekształceń. Pewną modyfikacją tej metody jest uprzednie mrożenie próbek w ciekłym freonie 22, a następnie przenoszenie ich do ciekłego azotu, gdzie poddawane są łupaniu [47]. Starsze metody preparacji wykorzystywały metody utrwalenia dla MET a następnie [14] suszenie preparatu w krytycznym punkcie CO_2 . Po wysuszeniu próbki zostają napyłone jak wyżej.

Wady i zalety różnych technik preparacji materiału roślinnego

Zastosowanie w typowej preparatyce do MET takich utrwalczy jak aldehyd glutarowy czy KMnO_4 powoduje ekstrakcję z komórki w znacznej ilości jonów K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} [29, 30], jak również niektórych składników komórki np. kryształów globoidu [31]. W przypadku ekstrakcji kryształów globoidu, co często zdarza się u roślin z rodziny *Fabaceae* przy stosowaniu konwencjonalnych metod preparacji, Darley i Lott [9] proponują metodę dodatkową. W takich sytuacjach proponują zamrożenie tkanki w ciekłym azocie i po otrzymaniu sproszkowanego preparatu umieszczenie go na siatkach pokrytych błonami oraz napylenie węglem. Kryształy globoidu są następnie identyfikowane na podstawie ich elektronowej gęstości.

Najbardziej odpowiednią techniką znaną dotychczas jest przygotowanie materiału poprzez jego bardzo szybkie zamrożenie. Ta technika nie zmienia naturalnego składu komórki oraz nie powoduje uszkodzeń mechanicznych. Jednak ze względu na konieczność posiadania kriostatu [52, 53] oraz utrzymanie niskiej temperatury podczas analizy, wykorzystanie tej metody jest ograniczone. Dobre wyniki uzyskuje się również przez zastosowanie utrwalania i wymiany wody na niewodne rozpuszczalniki w niskich temperaturach, a następnie infiltrację odpowiednim składem żywic w dodatnich temperaturach. Metoda ta może być powszechnie stosowana we wszystkich laboratoriach, które dysponują mikrosondą elektronową. Ponadto wykazano, że preparaty uzyskane metodą mrożenia lub wymiany wody na niewodne rozpuszczalniki w niskich temperaturach posiadały podobną koncentrację jonów [54]. Wyniki te dodatkowo uwidaczniają przydatność tej ostatniej metody w badaniach szeregu procesów fizjologicznych oraz wskazują na szeroką możliwość jej wykorzystania.

Przykłady zastosowania mikrosondy elektronowej

Ruchy chloroplastu *Mougeotia*. Ruch chloroplastu u *Mougeotia* do pozycji płaskiej indukowany jest światłem czerwonym. Ten typ ruchu kontrolowany jest przez fotokonwersję P_r do P_{fr} oraz powstanie gradientu P_{fr} pomiędzy przednią i tylną ścianą komórki a jej bokami. Jony Ca^{2+} odgrywają kluczową rolę w fitochromem sterowanej reakcji ruchowej chloroplastu [23]. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie jonów Ca^{2+} ulega zmianie podczas oświetlenia komórek światłem czerwonym lub podczerwienią. Za pomocą różnych metod cytochemicznych takich jak np. przyżyciowego barwienia czerwienią obojętną, rodaminą B lub wiązania Ca^{2+} chlorotetracykliną [21, 52] uzyskano jakościowe różnice w koncentracji Ca^{2+} przy zmianie warunków oświetlenia. Nie dawały one jednak odpowiedzi, w których organellach komórkowych Ca^{2+} jest magazynowany oraz w jakiej ilości jest pobierany ze środowiska zewnętrznego. Zastosowanie mikrosondy elektronowej wykazało, że fotokonwersja P_r do P_{fr} pod wpływem działania światła czerwonego prowadzi do wzrostu poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplaźmie przy równoczesnym obniżeniu jego koncentracji w pęcherzykach taninowych oraz w mitochondriach i ścianach

komórkowych. Część jonów Ca^{2+} jest również w tych warunkach importowana do komórki z otaczającego środowiska wodnego. Oświetlenie komórek glonu *Mougeotia* światłem podczerwonym prowadzi do fotokonwersji P_{fr} do P_r . Reakcja ta związana jest z obniżeniem poziomu wapnia w cytoplaźmie oraz jego kumulację w organellach komórkowych jak również wydalaniem do środowiska zewnętrznego. Ze względu na niezwykle szybkie zmiany w koncentracji jonów w komórkach kontrolowane przez fitochrom, preparaty zostały przygotowane przez zamrożenie glonu do -80°C [39]. Preparaty były łamane, a następnie analizowane w mikrosondzie elektronowej sprzężonej z MES [52]. Technika ta pozwalała na precyzyjne uchwycenie ilościowych różnic w koncentracji jonów Ca^{2+} .

Zmiany w koncentracji jonów w komórkach infekowanych wirusem

Wirus MRDV wywołuje skarłowacenie siewek *Zea mays* oraz prowadzi do tworzenia tumorów wewnątrz wiązek przewodzących [14, 15]. Efekty wywierane przez wirusa na zmiany koncentracji jonów określano w wewnątrznaczyniowej tkance tumorowej oraz obszarach wolnych od wirusa. W tym przypadku zastosowano utrwalanie tkanek z dodatkiem KPA, celem otrzymania strąków. Analiza koncentracji jonów wykazała, że tkanki nie infekowane wirusem zawierają większe ilości Ca^{2+} , natomiast obniżeniu ulega K^+ w porównaniu z tkanką tumorową. Różnice te wynoszą około połowę koncentracji Ca^{2+} i około 150% w przypadku jonów K^+ . Natomiast zawartość Si jak również P i S wzrastała w tkankach infekowanych. W przypadku P i S wzrost koncentracji w tkance tumorowej jest wynikiem wzrostu liczby wirusów i towarzyszącej im wiroplazmy [4]. Wyniki pozwalają sugerować, że różnice w koncentracji K^+ i Ca^{2+} w komórkach tkanki tumorowej związane są ze zmianami przepuszczalności plazmalemmy w przypadku infekcji wirusem, podobnie jak to ma miejsce w niektórych zwierzęcych nowotworach [20].

Koncentracja jonów w komórkach halofitów. Badania koncentracji jonów w cytoplaźmie i wakuoli komórek halofitów pozwoliło na stwierdzenie różnic w poziomie jonów nieorganicznych, wchodzących w skład osmotikum tych dwóch kompartmentów. Stosując wysoką koncentrację jonów w środowisku zewnętrznym komórki wykazano, jak wysokie ich stężenia mogą być tolerowane przez cytoplaźmę [40, 48]. Analizy komórek mezofilowych liścia *Atriplex spongiosa* za pomocą mikrosondy elektronowej wykazały, że w tych warunkach maksymalna koncentracja jonów K^+ i Na^+ wynosi w cytoplaźmie około 200 mM, a w wakuoli może osiągać wartość nawet 900 mM [49]. Ponadto stwierdzono różnice w stosunku K^+/Na^+ na korzyść jonów K^+ w cytoplaźmie, natomiast w wakuoli na korzyść jonów Na^+ . Równowaga potencjału osmotycznego pomiędzy cytoplaźmą a wakuolą musi być utrzymana. Niedobór związków osmotycznie czynnych w cytoplaźmie zostaje uzupełniony na drodze biosyntezy osmotycznie czynnych związków organicznych takich jak: betaina, glicyna i prolina, jak również sacharoza, co zostało wykazane metodami cytochemicznymi [40]. Nie został wykazany natomiast w cytoplaźmie

wzrost stężenia jonów nieorganicznych do poziomu ich koncentracji w wakuoli. Sugeruje to, że ich poziom w cytoplaźmie nie może przekraczać pewnego krytycznego pułapu [48].

Przedstawione przykłady stanowią jedynie wąski wycinek możliwości zastosowania mikrosondy elektronowej do precyzyjnego określenia koncentracji jonów w różnych mikroobszarach komórkowych.

LITERATURA

- [1] Andersen C. A., 1967. An introduction to the electron probe microanalyzer and its application to biochemistry. W: *Methods of Biochemical Analysis*, Glick O., ed. New York: Interscience, Vol. 15 str. 147—370.
- [2] Armstrong J. T., 1977. Quantitative electron microprobe analysis of airborne particulate material. Arizona State University, Tempe, Arizona.
- [3] Arsanto J. P., 1986. Ca⁺⁺ binding sites and phosphatase activities in sieve reticulum and P-protein of chick-pea phloem. A cytochemical and X-ray microanalysis survey. *Protoplasma* 132: 160—171.
- [4] Bassi M., Favali M. A., 1972. Electron microscopy of MRDV assembly sites in maize. Cytochemical and autoradiographic observations. *J. Gen. Virol.* 16: 153—160.
- [5] Bulger R. E., 1969. Use of potassium pyroantimonate in the localization of sodium ions in rat kidney tissue. *J. Cell. Biol.* 40: 79—94.
- [6] Chandler J. A., 1976. A method for preparing absolute standards for quantitative calibration and measurement of section thickness with X-ray microanalyses of biological ultrathin specimens in EMMA. *J. Microsc.* 106: 291—302.
- [7] Chandler J. A., 1980. Application of X-ray microanalysis in reproductive physiology. W: *Scanning Electron Microscopy*, Scanning Electron Microscopy Inc. O'Hare A. M. F., ed. III, Vol. II str. 475.
- [8] Clark M. A., Ackerman G. A., 1971. Alteration of nuclear and nucleolar by glutaraldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 19: 388—390.
- [9] Darley J. J., Lott J. N. A., 1973. Low temperature freeze-drying for the scanning electron microscope using liquid nitrogen at low vacuum. *Micron* 4: 178—182.
- [10] Eshel A., Waisel Y., 1978. Quantitative electron probe microanalysis of biological specimens. *Micron* 9: 155—159.
- [11] Fathers D. I., 1982. Standardless X-ray microanalysis applied to biological material. W: *Scanning Electron Microscopy*, Scanning Electron Microscopy Inc. O'Hare A. M. F., Vol. III.
- [12] Favali M. A., Barbieri N., Bonecchi R., 1977. Electron microscopy and X-ray microanalysis of antimonate precipitates in healthy and virus infected leaves in tobacco and maize. *Caryol.* 30: 4.
- [13] Favali M. A., Barbieri N., Bonecchi R., 1978. Electron microscopy and X-ray microanalysis of antimonate precipitates in healthy and virus infected leaves of tobacco. *Caryol.* Vol. 31, 331—342.
- [14] Favali M. A., Barbieri N., Bianchi A., Bonecchi R., Conti M., 1980. X-ray microanalysis of leaf tumors from maize plants experimentally infected with maize rough dwarf virus: Scanning and transmission electron microscopic study. *Virol.* 103: 357—368.
- [15] Favali M. A., Bassi M., Appiano A., 1974. Synthesis and migration of MRDV in the host cell: an autoradiographic study. *J. Gen. Virol.* 24: 563—565.
- [16] Fiori C. E., Myklebust R. L., Newbury D. E., 1979. A catalogue of artifacts observed in energy-dispersive X-ray spectrometry and their influence on analysis. W: *Microbeam Analysis in Biology*, Lechene C. P., Warner R. R., eds, New York: Academic Press, str. 255—263.
- [17] Fisher D. B., 1972. Artifacts in the embedment of water soluble compounds for light microscopy. *Plant Physiol.* 49: 161.
- [18] Fisher D. B., Housley T. H., 1972. The retention of water soluble compounds during freeze-substitution and microautoradiography. *Plant Physiol.* 49: 166.

- [19] Goldstein J. J., Newbury D. E., Echlin P., Joy D. C., Fiori Ch., Lifshin E., 1981. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Plenum Press, New York and London.
- [20] Grigolato P., Sala N., Bonocchi R., Valaguzza E., 1977. Valutazione ultrastrutturale della membrana della cellule neoplastiche in via di disseminazione. Il problema della metastasi. W: Atti XIV Congr. Naz. Soc. Ital. Patologia, Catania, Soc. Ed. Universo Roma, str. 95—107.
- [21] Grolig F., Wagner G., 1987. Vital staining permits isolation of calcium vesicles from the green alga *Mougeotia*. *Planta* 171: 433—437.
- [22] Gullash J., Kaufmann R., 1974. Energy dispersive X-ray microanalysis in soft biological tissue: relevance and reproducibility of the results as depending upon specimen preparation air drying, cryofixation, cool-stage techniques. W: Microprobe analysis as applied to cells and tissues, Hall T., Echlin P., Kaufmann R., eds. London — New York, Academic Press, str. 175—190.
- [23] Haupt W., 1983. Movement of chloroplasts under the control of light. *Prog. Phycol. Res.* 2: 228—277.
- [24] Heinrich K. F. J., 1981. Electron beam X-ray microanalysis. Van Nostrand-Reinhold, ed. New York.
- [25] Hołyńska B., Markowicz A., 1987. Metody analityczne wykorzystujące charakterystyczne promieniowanie X. *Ossolineum*.
- [26] Jenkins R., Gould R. W., Gedcke D., 1981. Quantitative X-ray spectrometry. Dekker M., ed. New York.
- [27] Kropf D. L., Quatrano R. S., 1987. Localization of membrane-associated calcium during development of fucoid alge using chlorotetracycline. *Planta* 171: 158—170.
- [28] Lisiecki W., Scharf W., 1973. Spektrometry rozkładów amplitudowych. PWN, Warszawa.
- [29] Lott J. N. A., 1978. Thin sectioning, freeze fracturing, energy dispersive X-ray analysis, and chemical analysis in the study of inclusions in seed protein bodies: almond, Brazil nut and quandong. *Can. J. Bot.* 56: 2050—2061.
- [30] Lott J. N. A., Greenwood J. S., Vollmer C. M., 1978. An energy dispersive X-ray analysis study of elemental loss from globoid crystals in protein bodies as a result of osmium tetroxide fixation. *Can. J. Bot.* 56. 2408—2414.
- [31] Lott J. N. A., Larsen P. L., Darley J. J., 1971. Protein bodies from the cotyledons of *Cucurbita maxima*. *Can. J. Bot.* 49: 1777—1782.
- [32] Markowicz A., Van Grieken R. E., 1984. X-ray spectrometry. *Anal. Chem.* 56: 241—250.
- [33] Markowicz A., Van Grieken R. E., 1984. Composition dependence of bremsstrahlung background in elektron-probe X-ray microanalysis. *Ana. Chem.* 56: 2049—2051.
- [34] Markowicz A., Van Grieken R. E., 1986. X-ray spectrometry. *Ana. Chem.* 58: 279—294.
- [35] Marshall A. T., 1980. Recording transmitted beam current for X-ray microanalysis in a scanning transmission electron microscope. *J. Microsc.* 120: 207—211.
- [36] Marshall A. T., Carde D., 1984. Beryllium coating for biological X-ray microanalysis. *J. Microsc.* 134: 113—116.
- [37] Morgan A. J., Davies T. W., 1982. An electron microprobe study of the influence of beam current density on the stability of detectable elements in mixes-salts isoatomic microdroplets. *J. Microsc.* 125: 103—116.
- [38] Nicholson W. A. P., Gray C. C., Chapman J. N., Robertson B. W., 1982. Optimizing thin film X-ray spectra for quantitative analysis. *J. Microsc.* 125: 25—40.
- [39] Pallaghy G. K., 1973. Electron probe microanalysis of potassium and chloride in freeze-substituted leaf sections of *Zea mays*. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 1015—1034.
- [40] Pollard A., Wyn Jones R. G., 1979. Enzyme activities in concentrated solutions of glycine-betaine and other solutes. *Planta* 144: 291.
- [41] Reed S. J. B., 1975. Electron microprobe analysis. Cambridge University Press, Cambridge.
- [42] Roomans G. M., 1979. Standards for X-ray microanalysis of biological specimen. W: Scanning Electron Microscopy, Scanning Electron Microscopy Inc. O'Hare A. M. F., ed. Vol. II., str. 649—657.
- [43] Russ J. C., 1974. X-ray microanalysis in the biological sciences. *J. Submic. Cytol.* 6: 55—79.
- [44] Spurr A. R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultr. Res.* 26: 31—43.

- [45] Spurr A. R., 1975. Choice and preparation of standards for X-ray microanalysis of biological materials with special reference to macrocyclic polyether complexes. *J. Microsc.* 22: 287—302.
- [46] Statham P. J., 1980. X-ray microanalysis with Si/Li detectors. *J. Microsc.* 123: 1—23.
- [47] Stelzer R., Lauchli A., 1978. Salt and flooding tolerance of *Puccinellia peisonis*. III. Distribution and localization of ions in the plant. *Z. Pflanzenphysiol.* 88: 447—448.
- [48] Storey R., Pitman M. G., Stelzer R., Carter C., 1983. X-ray microanalysis of cells and cell compartments of *Atriplex spongiosa*. *J. Exp. Bot.* 34: 778—794.
- [49] Storey R., Wyn Jones R. G., 1979. Responses of *Atriplex spongiosa* and *Suaeda monoica* to salinity. *Plant Physiol.* 63: 156—162.
- [50] Tertian R., Claisse F., 1982. Principles of quantitative X-ray fluorescence analysis. Heyden, London
- [51] Talmon Y., Davis H. T., Scriven L. E., Thomas E. L., 1979. Mass loss and etching of frozen hydrated specimens. *J. Microsc.* 117: 321—332.
- [52] Wagner G., Rossbacher R., 1980. X-ray microanalysis and chlorotetracyclina staining of calcium vesicles in the green alga *Mougeotia*. *Planta* 149: 298—305.
- [53] Yeo A. R., Lauchli A., Kramer D., Gullasch J., 1977. Ion measurements by X-ray microanalysis in unfixed, frozen, hydrated plant cells of species differing in salt tolerance. *Planta* 134: 35—38.
- [54] Zyl van J., Forrest Q. G., Hocking C., Pallaghy C. K., 1976. Freeze substitution of plant and animal tissue for the localization of water-soluble compounds by electron probe microanalysis. *Micron* 7: 213—224.

mgr Tadeusz Bochnia

mgr Anna Homińska

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin

Uniwersytetu Jagiellońskiego

Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków