

# SKANINGOWY MIKROSKOP ELEKTRONOWY W BADANIACH KARPOLOGICZNYCH

## Scanning electron microscope in carpological studies

Jagna KARCZ

**Summary.** The structure of plant surfaces has been intensively studied under taxonomic and ecological aspects. During the last decade the application of scanning electron microscope has greatly increased our knowledge of plant surfaces. The SEM is a surface microscope and the subject under examination is the natural primary surface of a plant – the epiderm, which covers i. e. seeds and fruits. Structurally, epiderms are usually rather thick-walled and stable in a vacuum: this allows quick preparation for SEM examinations, without the need for complicated dehydration techniques. Epidermal characters of seeds and fruits are surprisingly little affected by the environmental conditions in which a plant grows: there is evidence for a strong genetic control over these characters. Their high structural diversity provides most valuable criteria for the classification between species and family level. The comprehensive bibliography of Brisson and Peterson [13] indicates the value of the SEM for the study of seeds and fruits. Surface characters may be grouped into four categories (Figs. 1, 4): (1) cellular arrangement or cellular pattern, (2) Shape of cells (the „primary sculpture” of a surface), (3) Relief of outer cell walls (the „secondary sculpture” superimposed on the primary sculpture), caused mainly by cuticular striations and superficially visible wall inclusions and wall thickenings, (4) Epicuticular secretions (the „tertiary sculpture” superimposed on the secondary sculpture), i. e. mainly waxes and related substances. Micromorphological and ultrastructural data have contributed invaluable information to our understanding of the evolution and classification of seed plants and play an important role in the modern syntetic systems of *Angiosperms* (e.g. Dahlgren [18]).

**Key words:** scanning electron microscope, seed, fruit, surface characters, taxonomy

*Dr Jagna Karcz, Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Śląski, ul. Jagiellońska 28, 40–032 Katowice*

### WSTĘP

Spośród organów generatywnych roślin kwiatowych nasiona i owoce należą nadal do najmniej poznanych. Przetrawnikowy charakter i związana z tym konieczność diagnozowania tych diaspor oraz bogata ich różnorodność morfologiczno-anatomiczna stały się podstawą wyodrębnienia w botanice dziedziny zwanej karpologią [17, 18, 49, 52, 62, 70, 74]. Rozwój karpologii, zwłaszcza w drugiej połowie XX wieku, wynika przede wszystkim z ciągłego udoskonalania technik badawczych, co pozwoliło przejść od klasycznej metody obserwacyjno-opisowej w mikroskopie świetlnym (LM) do metod pełnej interpretacji na podstawie obrazów

(elektronogramów) z transmisyjnego oraz skanującego mikroskopu elektronowego (TEM, SEM).

Strukturalne cechy organów generatywnych, takich jak kwiaty, nasiona i owoce już od dawna są wykorzystywane jako cechy o dużej wartości diagnostycznej w badaniach taksonomicznych. Cechy te określa się najczęściej jako „dobre” cechy przydatne do oznaczania taksonów różnej rangi. „Dobre” są to takie cechy, które nie podlegają szerokiej zmienności i mogą zachowywać się faktycznie nie zmienione pod wpływem różnych czynników środowiska [31, 39]. Ponadto cechy te posiadają większą wartość w klasyfikacji roślin niż struktura organów wegetatywnych (na przykład łodyga, liście), które częściej ule-

gają modyfikacjom środowiskowym. Po wszechnie wiadomo, że w klasyfikacji i filogenezie *Angiospermae* najbardziej użyteczne są cechy kwiatów, jako wartościowe i pewne kryterium taksonomiczne. W tak dużych rodzinach, jak *Ranunculaceae* czy *Asteraceae* szczególnie istotny jest typ kwiatu lub kwiatostanu i ich budowa. Natomiast morfologiczne cechy nasion i owoców są najczęściej uzupełniającymi cechami diagnostycznymi, chociaż w pewnych grupach systematycznych mogą mieć duże znaczenie taksonomiczne. W rodzinach *Apiaceae*, *Brassicaceae*, *Rosaceae* cechy owoców są najbardziej użyteczne ze wszystkich cech. W rodzinie *Caryophyllaceae* różnice w budowie nasion pozwalają na rozgraniczenie jednostek taksonomicznych na poziomie gatunku, a nawet podgatunku czy odmiany. Odrębności poszczególnych diaspor mogą być wyraźne, ledwie dostrzegalne lub zupełnie niewidoczne. Zawsze jednak ujawniają one pewną indywidualność z zachowaniem cech podstawowych, charakterystycznych dla rodzaju, sekcji, gatunku czy odmiany. Warto nadmienić, że tylko nasiona i owoce w pełni dojrzałe gwarantują poprawną identyfikację taksonomiczną [27, 46].

W tym kontekście nieustannie pojawia się pytanie, czy istnieją jakieś cechy, na których taksonomicznej istotności można zawsze polegać? Z wielu opracowań taksonomicznych wynika, że u okrytonasiennych cechy organów generatywnych są najczęściej używane spośród cech diagnostycznych i włączane w opisy taksonów [10, 16, 28, 65]. Stanowią one zatem grupę cech o dużym znaczeniu taksonomicznym.

Aktualnie w badaniach karpologicznych coraz większego znaczenia, oprócz cech morfologicznych, nabierają cechy mikrostrukturalne powierzchni. Szczegółowa analiza powierzchni nasion i owoców, a więc epidermy zewnętrznej łupiny nasiennej i owocni, stała się możliwa dzięki wprowadzeniu do badań morfologicznych skaningowego mikroskopu elektronowego. Początki badań w tym zakresie sięgają drugiej połowy lat 60. naszego wieku [2, 13, 60, 66]. Na przestrzeni zwłaszcza ostatnich 20 lat skaningowa mikroskopia elektronowa (technika SEM) w sposób istotny przyczyniła się do po-

znania różnych struktur powierzchniowych. Wzory komórkowe powierzchni oraz urzeźbienie zewnętrznych ścian komórkowych epidermy mogą być w wielu przypadkach dobrym kryterium taksonomicznym na poziomie gatunku, sekcji, rodzaju [61]. Potrzeba stosowania zatem SEM w tych badaniach wynika z dwóch powodów. Po pierwsze, mikroskopia skaningowa odsłania dotąd niedostrzegane szczegóły struktury powierzchni epidermy. Po drugie, dostarcza szeregu nowych cech mikrostrukturalnych, bardziej wiarygodnych i fundamentalnych, mających niejednokrotnie decydujące znaczenie przy identyfikacji dyskusyjnych taksonów. Wiele z tych cech, takich jak układ i kształt komórek epidermalnych oraz urzeźbienie ich zewnętrznych ścian komórkowych, weszło do praktyki botanicznej jako standardowe cechy taksonomiczne [3, 9, 36, 42]. Określona struktura łupiny nasiennej lub owocni może być typowa i charakterystyczna dla całej rodziny (*Compositae*, *Leguminosae*, *Valerianaceae*) lub też wyraźnie zróżnicowana w obrębie tej samej grupy (*Papaveraceae*, *Onagraceae*, *Scrophulariaceae*). W rodzinie *Apiaceae* takie cechy, jak ilość rzędów i układ kolców na owocach oraz ich ornamentacja są używane do rozdzielania ściśle spokrewnionych rodzajów. Również cechy anatomiczne nasion i owoców są szeroko wykorzystywane w systematyce jako uzupełniające cechy taksonomiczne [5, 36, 47, 59, 72]. Ponadto za prowadzeniem obserwacji epidermy w mikroskopie skaningowym przemawiają 4 argumenty:

1. bogate zróżnicowanie strukturalne;
2. stała obecność w badanym materiale, a także na obiektach zielnikowych oraz fosylnych;
3. najczęściej grubościenny charakter dodatkowo zabezpieczający przed niekorzystnymi warunkami próżni mikroskopowej;
4. mała podatność na warunki środowiska i tym samym stałość wzorów komórkowych powierzchni.

#### METODY PRZYGOTOWANIA PRÓBEK

Mikroskop skaningowy umożliwia obserwację zewnętrznej powierzchni komórek, połączeń

międzykomórkowych, a także struktur wewnątrzkomórkowych. Jest to możliwe dzięki stale doskonalszej optyce elektronowej skaningowego mikroskopu elektronowego oraz opracowaniu szeregu specyficznych metod przygotowania (utrwalenia, odwodnienia) obiektów roślinnych do badań w SEM. Metody przygotowania próbki (preparatu) do obserwacji w SEM zależą przede wszystkim od rodzaju obiektu badawczego. Obiekty twarde, takie jak dojrzałe nasiona i owoce, pyłki kwiatów, zarodniki roślin niższych, nie wymagają wstępnych czynności przygotowawczych, a więc bez utrwalenia mogą być bezpośrednio po napyleniu badane w SEM. Obiekty miękkie (tkanki roślinne silnie uwodnione) wymagają utrwalenia i odwodnienia w celu uniknięcia artefaktów związanych z wysuszeniem próbki [14]. Zalety techniki SEM dotyczą głównie łatwości przygotowania próbki (całe obiekty) lub preparatu (przekroje, wycinki tkanek), wielkiej głębi ostrości obrazu, możliwości dokonywania dodatkowych zabiegów w czasie obserwacji (np. wytrawiania preparatu), uzyskiwania charakterystyki chropowatości powierzchni w formie oscylacji prądu związanego z wiązką elektronów, a przy zastosowaniu dodatkowego wyposażenia – określenia składu chemicznego próbki [30].

#### BADANIE STRUKTUR ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Metody przygotowania próbki do obserwacji w SEM są zróżnicowane i zależą przede wszystkim od stopnia uwodnienia danego obiektu [14, 22, 26]. Obiekty twarde (dojrzałe nasiona i owoce), z uwagi na grubościenny charakter łupin nasiennych i owocni oraz niski stopień uwodnienia tkanek, nie zmieniają swojej naturalnej struktury w warunkach próżni mikroskopowej. Procedura postępowania nie wymaga zatem stosowania wstępnych technik dehydracyjnych. Ponadto substancje inkrustujące lub adkrustujące ściany komórek epidermalnych dodatkowo zabezpieczają badane obiekty przed oddziaływaniem próżni. W tym przypadku sposób postępowania obejmuje 3 etapy:

1. mechaniczne oczyszczenie powierzchni próbek,
2. napylenie,
3. właściwa obserwacja w SEM z równoczesnym wykonaniem dokumentacji fotograficznej.

Obiekty o nieuszkodzonych powierzchniach, wybrane za pomocą binokularu lub mikroskopu steroskopowego umieszcza się na standardowych krążkach aluminiowych za pomocą srebrnej pasty. Następnie próbki pokrywa się węglem i złotem technicznym w napyłarce metodą odparowania metalu. Warstwa napyłająca redukuje niekorzystny efekt związany ze skondensowaną wiązką elektronów w komorze mikroskopu oraz poprawia jakość uzyskanych obrazów. Jeżeli powierzchnia nie zostanie odpowiednio zabezpieczona przez napylenie wartości poznawcze otrzymanych elektronogramów są niewielkie [20, 33]. Dlatego też wszystkie twarde obiekty roślinne powinny być napyłone. Tak wykonane próbki są gotowe do obserwacji w mikroskopie skaningowym.

Natomiast przygotowanie obiektów miękkich (nasiona i owoce we wczesnych stadiach rozwojowych) do badań w SEM obejmuje następujące etapy:

1. utrwalanie,
2. odwadnianie,
3. suszenie,
4. napylenie,
5. właściwa obserwacja.

Jeżeli próbka (preparat) jest uwodniona, to w próżni woda wyparowuje, a obiekt ulega zamrożeniu. Siły napięcia powierzchniowego wzrastające w czasie procesu parowania sprzyjają wykrysztalizowaniu się mikrokryształów lodu, co niekorzystnie wpływa na jakość uzyskanych obrazów. Suszenie próbek na powietrzu powoduje powstanie licznych artefaktów powierzchniowych. Mniej zniekształceń powierzchni komórek obserwuje się wtedy, gdy w procesie przygotowania preparatu przed suszeniem zastosuje się odpowiednie odczynniki utrwalające i odwadniające [57].

1. Utrwalanie. Warunkiem otrzymania dobrego obrazu w SEM jest właściwe utrwalenie próbki. Zarówno sposób postępowania, jak i ro-

dziej mieszaniny utrwalającej są podobne do stosowanych w technice mikroskopii elektronowej transmisyjnej [22]. W praktyce są stosowane następujące utwalacze: 1,5% do 3% roztwór aldehydu glutarowego (GA) w buforze fosforanowym lub kakodylowym; 1% lub 2% roztwór czterotlenku osmu ( $\text{OsO}_4$ ) w buforze fosforanowym; utwalacz Karnovsky'ego – paraformaldehydowo-glutarowoaldehydowy w buforze fosforanowym; mieszanina utwalaczy: aldehyd glutarowy i czterotlenek osmu w buforze kakodylowym; akroleina; akroleina – aldehyd glutarowy; utwalacz CrAF (kwas chromowy, kwas octowy, formalina); FAA (formalina, kwas octowy, alkohol etylowy) oraz nadmanganian potasu. Wyżej wymienione utwalacze z reguły wolno wnikają do wnętrza błoczka tkankowego i dlatego należy dla uzyskania właściwego efektu utrwalania pobierać odpowiednio małe wycinki nasion i owoców [11, 54, 58]. Mersey i McCully [50] zwracają uwagę na utwalacz akroleina – aldehyd glutarowy jako szczególnie przydatny do utrwalania tkanek o grubych ścianach komórkowych. Ponadto obiekty uwodnione, takie jak nasiona i owoce we wczesnych stadiach rozwojowych, wykazują dużą wrażliwość na osmolarność utwalacza i w związku z tym ważne jest, aby dostosować stężenie utwalacza i buforu do właściwości utrwalanego materiału. Przeciętny czas utrwalania od 1–3 h (max. do 48 h) w temperaturze od 0–4°C lub w temperaturze pokojowej [55].

2. Odwadnianie. Proces ten przeprowadza się we wzrastających stężeniach alkoholu etylowego lub acetonu (30%, 50%, 70%, 85%, 95% przez 5–10 min.). Następnie próbkę (preparat) przenosi się do alkoholu etylowego absolutnego lub acetonu i kilkakrotnie płucze przez kilka minut (max. 30–60 minut) [35].

3. Suszenie. Kolejnym ważnym etapem w procesie przygotowania próbek jest suszenie. Najczęściej stosuje się suszenie w tzw. punkcie krytycznym przy użyciu  $\text{CO}_2$  i urządzenia pod nazwą Critical Point Drying (metoda CPD), wprowadzona do mikroskopii elektronowej w 1951 roku przez Andersona [1]. Metoda opiera się na wykorzystaniu zjawiska polegającego na tym, iż w tzw. punkcie krytycznym ciecz prze-

chodzi w gaz, a zjawisku temu nie towarzyszą siły zniekształcające [15]. Klasyczną już metodę CPD można zastąpić metodą suszenia z użyciem odczynnika Peldri II (komponent fluorokarbonowy) w eksykatorze próżniowym, gdzie zachodzi sublimacja próbki [43]. Metoda ta umożliwia uzyskanie obrazów nie odbiegających jakością od obrazów mikroskopowych otrzymanych w tradycyjny sposób. Odczynnik Peldri II można włączyć również do etapu odwadniania próbek. Wyżej wymienione metody można również stosować w przypadku innych obiektów roślinnych [35, 38, 40, 67].

4. Napylenie. Następnie badany obiekt przenosi się do napyłarki próżniowej wyposażonej w urządzenie rotacyjne oraz napyłające. Czas napylenia należy ustalić doświadczalnie. Jeżeli warstwa pokrywająca preparat jest zbyt gruba, wtedy nie są widoczne szczegóły badanej powierzchni. Po przeniesieniu stolików z napylnym materiałem do komory próżniowej mikroskopu, można przystąpić do właściwych obserwacji i wykonania dokumentacji fotograficznej [19].

#### BADANIE STRUKTUR WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Budowę wewnętrzną nasion i owoców oraz innych obiektów roślinnych można badać w SEM wyłącznie po zastosowaniu odpowiednich metod przygotowawczych. W mikroskopie skaningowym możliwa jest obserwacja następujących rodzajów próbek: przekroje poprzeczne, podłużne lub wycinki tkanek pochodzące z obiektów nieutrwalonych bądź z chemicznie utrwalonych, skrawanych ręcznie lub mikrotomowo [56, 53, 63, 24]. Ponadto w SEM można obserwować grube skrawki ręczne pochodzące z suchych i twardych obiektów (Ryc. 1 E, F). Skrawki te naklejamy bezpośrednio na stolik aluminiowy, napylamy i obserwujemy w mikroskopie.

Sposób postępowania w przypadku próbek nieutrwalonych (dojrzałe nasiona, owoce) przedstawia się następująco:

1. skrawanie ręczne lub mikrotomowe (skrawki o grubości od 30–40  $\mu\text{m}$ ),
2. naklejanie skrawków na szkiełko nakrywkowe za pomocą cienkiej warstwy gliceryny i

białka w stosunku 1:1 lub bezpośrednio na powierzchni stolika,

3. suszenie na powietrzu lub w termostacie w temp. 35°C przez 24 h,

4. pocięcie szkiełek nakrywkowych na kawałki z użyciem ołówka diamentowego,

5. naklejenie szkiełek na stolik aluminiowy,

6. napylenie i obserwacja w SEM.

Natomiast przygotowanie próbek chemicznie utrwalonych do badań w SEM obejmuje następujące etapy: utrwalanie, odwadnianie, suszenie w CPD, napylenie i właściwa obserwacja. Procedura utrwalania i odwadniania są podobne do stosowanych w transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Poszczególne etapy postępowania są następujące:

1. utrwalanie próbek (preparatów) w 2% lub 3% aldehydzie glutarowym w buforze fosforanowym o stężeniu 0,1 mol/l i pH=7,2 w temperaturze pokojowej lub w 4°C od 1–3 h (max. do 48 h),

2. odwadnianie we wzrastających stężeniach alkoholu etylowego lub acetonu (10–15 min.) oraz w absolutnym alkoholu lub acetonie przez 10–30 min.,

3. suszenie w punkcie krytycznym,

4. napylenie węglem i złotem technicznym,

5. obserwacja w SEM.

Olsen [53] opracował metodę przygotowania do obserwacji w SEM skrawków z ziarniaków jęczmienia. Poszczególne czynności są następujące:

1. wykonanie skrawków o grubości 40 µm z suchych owoców za pomocą mikrotomu zamroźeniowego,

2. utrwalanie skrawków w 2,5% glutaraldehydzie w 0,1 M buforze kakodylowym o pH=7,4 przez 10 h,

3. płukanie w buforze 2 razy po 30 min.,

4. dotrwalanie skrawków w 2% OsO<sub>4</sub> w buforze fosforanowym o pH=7,4 przez 5 h,

5. odwadnianie w serii alkoholowej po 20 min.,

6. naklejenie skrawków na stolik aluminiowy,

7. napylenie i obserwacja.

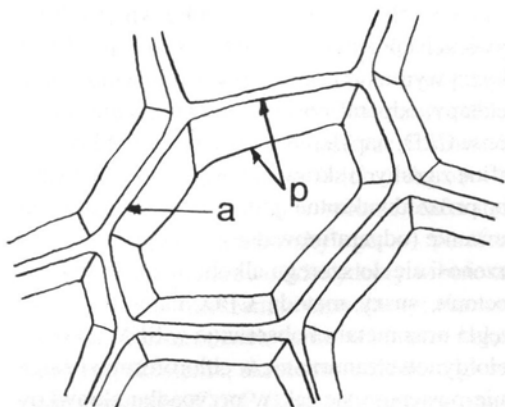
Natomiast Mc Donald, Pease i Hayes [50], Hodgkin [32], Panessa i Gennaro [54] oraz Robinson [57] opracowali metody przygotowania obiektów roślinnych i zwierzęcych zatopionych

w bloczkach parafinowych, celoidynowych lub żywicach epoksydowych do obserwacji w SEM. Wyżej wymienione metody obejmują następujące etapy: odparafinowanie, odwodnienie, suszenie w CPD, napylenie i obserwację w SEM. Parafinę z grubych skrawków parafinowych usuwa się przez dwukrotne płukanie w ksylenie lub benzenie (odparafinowanie), następnie wycinek przenosi się do szeregu alkoholu etylowego lub acetonu, suszy metodą CPD, napyła warstwą węgla oraz metalu i obserwuje w SEM. Bloczki celoidynowe zanurza się w chloroformie i następnie postępuje się jak w przypadku skrawków parafinowych. Można również przy użyciu mikrotomu wykonać seryjne skrawki o grubości od 15–20 µm (max. do 100 µm), przytwierdzić za pomocą lepika do małego szkiełka nakrywkowego, odparafinować, odwodnić, wysuszyć, napylić i przenieść do kolumny CPD [43]. Natomiast wprowadzenie w 1976 roku przez Geisingera [25] metody pozwalającej na badanie tkanek zatopionych w żywicach epoksydowych jest niewątpliwym postępem, gdyż umożliwia prowadzenie porównawczych badań tych samych struktur w LM, TEM i SEM. Makita i Sandborn [48] opracowali metodę pozwalającą na badanie seryjnych skrawków (1–100 µm) tkanki, utrwalonej jak do badań w TEM, (utrwalanie w aldehydzie glutarowym i dotrwalanie w czterotlenku osmu) lecz niezatopionej w żywicy epoksydowej. Do skrawiania używa się automatycznego urządzenia skrawającego lub mikrotomu zamroźeniowego. Wyżej wymienione metody stosowane są zarówno dla obiektów roślinnych jak i zwierzęcych.

#### INTERPRETACJA OBRAZU MIKROSKOPOWEGO

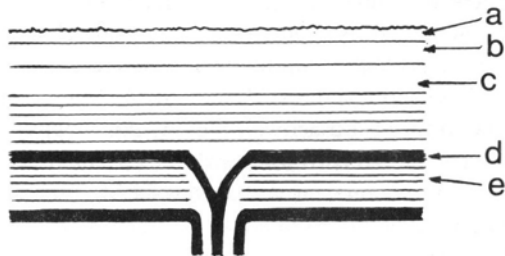
Nasiona i owoce mają różnorodnie ornamentowaną powierzchnię. Podstawowym jej elementem jest komórka epidermalna łupiny nasiennej (testy) lub owocni (egzokarpium), o różnie wykształconej zewnętrznej ścianie peryklinalnej (Ryc. 2, 3).

Zgodnie z Barthlottem [6, 7] mikrocechy powierzchni epidermy nasion i owoców należą do 4 grup:



Ryc. 2. Fragment powierzchni owocu *Valeriana simplicifolia* (Reichen) Kabath. Pojedyncza, zapadnięta komórka epidermalna owocni, X 1500; a — antyklinalny zarys komórki, p — zewnętrzna ściana peryklinalna.

Fig. 2. Detail of the fruit surface of *Valeriana simplicifolia* (Reichen) Kabath. Single collapsed epidermal cell of pericarp, X 1500; a — anticlinal outline of cell, p — outer periclinal wall.



Ryc. 3. Schemat zewnętrznej ściany peryklinalnej komórki epidermy; a — epikutykularny wosk, b — kutykula pierwotna, c — kutykula wtórna, d — warstwa pektynowa, e — zewnętrzna ściana peryklinalna (wg [69], zmodyfikowano).

Fig. 3. Interpretation of the outer periclinal wall layers of epidermal cell; a — epicuticular wax, b — primary cuticle, c — secondary cuticle, d — pectin layer, e — outer periclinal wall (after [69], modified).

1. Wzór komórkowy lub układ komórkowy powierzchni (cellular pattern) – jest to specyficzna dla danego obiektu (taksonu) orientacja przestrzenna komórek epidermalnych wraz z różnorodnymi strukturami zewnętrznymi (włoski, brodawki, kolce). Theobald i inni [64] przypisują taksonomiczne znaczenie tej cechy powierzchni w określaniu taksonów na poziomie rodzaju i gatunku.

2. Pierwotna skulptura – kształt komórek epidermalnych (Ryc. 1 A, B, C, D). W obrębie tej zasadniczej grupy wyróżnia się 4 mniejsze grupy mikrocech:

a) zarys komórek – najczęściej wieloboczny, izodiametryczny lub wydłużony w jednym kierunku,

b) ukształtowanie ścian antyklinalnych – widocznych w SEM jako granice komórkowe (cell boundaries), które są zazwyczaj proste, nieregularnie powyginane (S-, U-, Omega-, V-kształtne), zapadnięte lub podwyższone.

c) urzeźbienie antyklinalnych granic komórkowych (relief of cell boundaries) – granice mogą być gładkie, prążkowane, pofalowane lub wykazują pośrednie formy urzeźbienia,

d) zarys zewnętrznych ścian peryklinalnych (curvature of outer periclinal walls). Zarys tych ścian determinują (makroskopowo widoczne w SEM) nierówności powierzchni. Komórki mogą być płaskie, zapadnięte lub wypukłe. W obrębie komórek wypukłych mogą występować formy pośrednie takie jak: stożkowate, kopulaste, brodawkopodobne. Opisana mikrocecha jest dobrą cechą taksonomiczną.

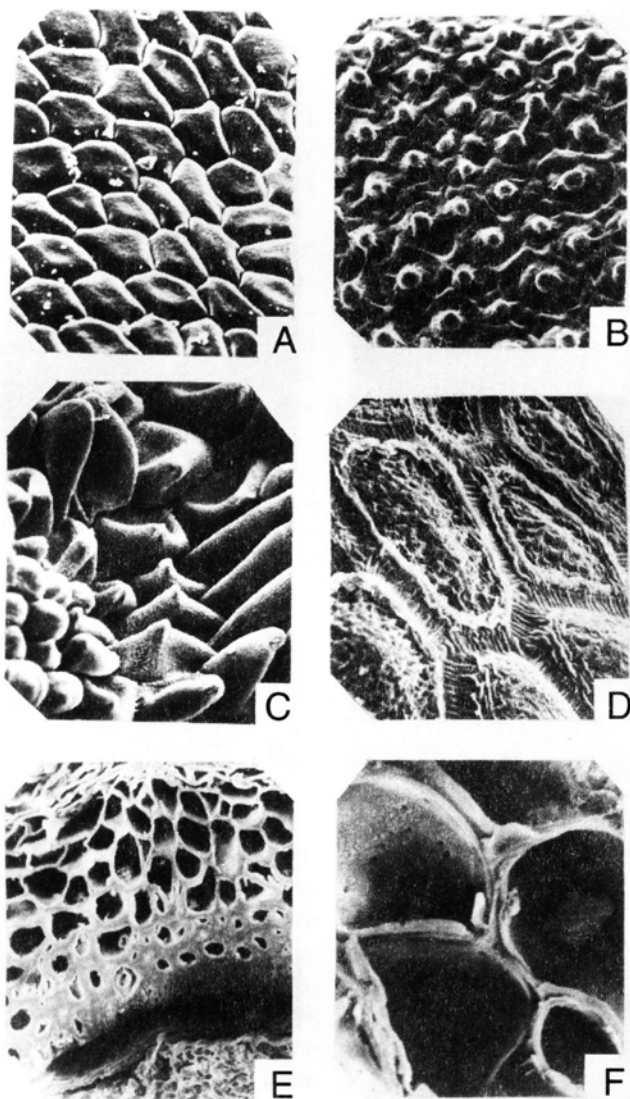
3. Wtórna skulptura – delikatna mikroornamentacja zewnętrznych ścian komórkowych – kutykuli (Ryc. 1 C, D). Może charakteryzować się następującym wzorem kutykularnym:

a) I rzędowa skulptura – nienaruszona powierzchnia kutykuli. Może być gładka, prążkowana, siatkowana, drobnobrodawkowana lub wykazywać różne wzory pośrednie. Ta mikroornamentacja kutykularna stanowi ważne kryterium taksonomiczne w oznaczaniu taksonów różnej rangi.

b) II rzędowa skulptura – wewnętrzna strona zewnętrznych ścian peryklinalnych, określanych jako wtórne zgrubienia ścian (secondary wall thickenings). Odślania się podczas dojrzewania nasion i owoców w wyniku zapadnięcia się zewnętrznych ścian komórkowych. Wtórna skulptura jest najczęściej specyficzna na poziomie rodzaju i gatunku [12, 60].

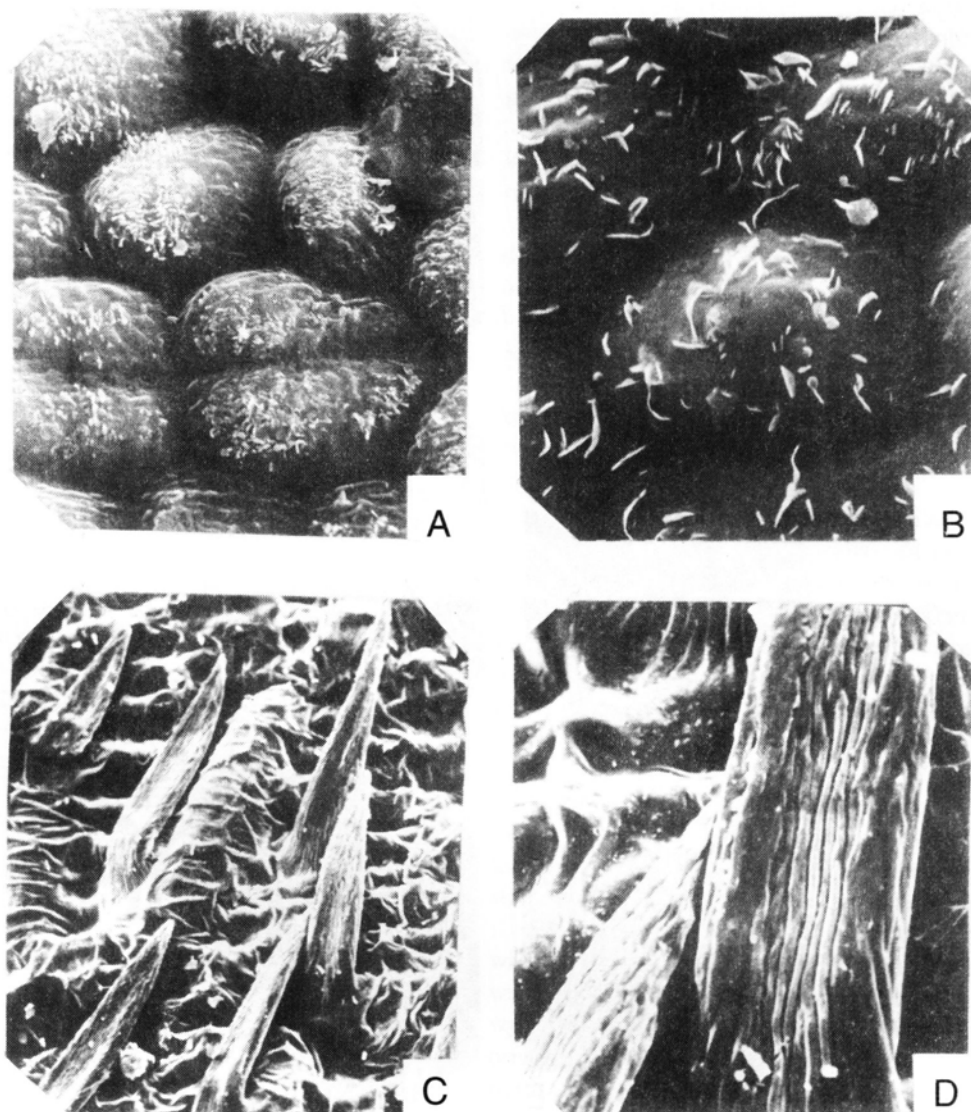
4. III rzędowa skulptura – epikutykularny wosk (Ryc. 4, A, B). Powierzchnia zewnętrzna kutykuli zazwyczaj jest pokryta nalotem woskopodobnym, którego struktura może być bardzo





Ryc. 1. Powierzchnia nasion i owoców w SEM. A — *Nigella ciliaris* DC., wielokątne komórki epidermalne łupiny nasiennej o gładkiej skulpturze zewnętrznych ścian peryklinalnych, X 250; B — *Arabidopsis suecica* (Fries) Norrlin, komórki epidermalne testy z brodawkopodobnym wypukleniem zewnętrznych ścian peryklinalnych, X 500; C — *Nigella damascena* L., komórki epidermalne testy ze stożkowatym wybrzuszeniem, X 250; D — *Nigella orientalis* L., sześciokątne komórki epidermalne testy z prążkowanymi granicami antyklinalnymi i pomarszczoną wtórną skulpturą zewnętrznych ścian peryklinalnych, X 500; E — *Potamogeton crispus* L., fragment przekroju poprzecznego owocu i łupiny nasiennej, X 250; F — *Potamogeton crispus* L., fragment przekroju poprzecznego endokarpium ze zeskleryfikowanym mięsiskiem, X 1000.

Fig. 1. Surface sculptures of seeds and fruits, SEM photomicrographs. A — *Nigella ciliaris* DC., polygonal cells of the seed coat with smooth secondary sculpture of outer periclinal walls, X 250; B — *Arabidopsis suecica* (Fries) Norrlin, testa cells with papilla-like projection of outer periclinal cell walls, X 500; C — *Nigella damascena* L., epidermal testa cells with conical projection of cell wall, X 250; D — *Nigella orientalis* L., hexagonal cells of the seed coat with striated anticlinal walls and rugosed secondary surface sculpturing, X 500; E — *Potamogeton crispus* L., part of the transverse section of the pericarp and seed coat, X 250; F — *Potamogeton crispus* L., part of the transverse section of the endocarp showing sclerified parenchymatous cells, X 1000.



Ryc. 4. Powierzchnia owoców w SEM. A — *Valeriana pyrenaica* L., komórki egzokarpium z drobnymi strukturami epikutularnego wosku na powierzchni zewnętrznych ścian peryklinalnych, X 1500; B — *Valeriana montana* L., komórki epidermalne owocni z delikatnymi i pojedynczymi łuskami woskopodobnymi, występującymi na powierzchni zewnętrznych ścian peryklinalnych, X 2000; C — *Sherardia arvensis* L., pojedyncze włoski na powierzchni owocu, X 250; D — *Sherardia arvensis* L., fragment jednokomórkowego włoska z podłużnie prążkowaną wtórną ornamentacją, X 1000.

Fig. 4. Surface sculptures of fruits, SEM photomicrographs. A — *Valeriana pyrenaica* L., exocarps cells with fine epicuticular wax secretion on the outer periclinal walls, X 1500; B — *Valeriana montana* L., epidermal cells of pericarp with fine and scattered flakes of epicuticular wax predominately located over the periclinal walls, X 2000; C — *Sherardia arvensis* L., fruit surface with simple hairs, X 250; D — *Sherardia arvensis* L., detail of unicellular hair of fruit surface showing a linear ridged secondary ornamentation, X 1000.

różnorodna [8, 21, 73]. Pod względem morfologicznym epikutularny wosk jest klasyfikowa-

ny w 6 grupach [2, 37]. Woski występują najczęściej jako delikatne warstwy, różnie ukształ-



towane i rozmieszczone, które mogą jednak ulegać uszkodzeniu podczas stosowania techniki SEM. Wzór epikutularnego nalotu jest bardziej podatny na oddziaływanie czynników środowiska, niż cechy wynikające ze skulptury I- i II-rzędowej, niemniej jednak stanowi on ważny element mikromorfologicznej różnorodności nasion i owoców [3].

Opisując różne struktury powierzchniowe widoczne w SEM, należy również zwrócić uwagę na specyficzną ornamentację kutykuli pokrywającej włoski epidermalne [23, 41]. Włoski mają najczęściej wtórną skulpturę lub połączenie 2 rodzajów ornamentacji: wtórnej i III-rzędowej (Ryc. 4 C, D). Różnice w mikroornamentacji włosków pozwalają również na rozgraniczenie jednostek taksonomicznych na różnych poziomach.

Reasumując, badania nasion i owoców w SEM potwierdzają mikrostrukturalne zróżnicowanie ich powierzchni na poziomie cech I-, II-, i III-rzędowych, znacznie ułatwiających oznaczenie taksonów. Mikroskulptury dostarczają szeregu uzupełniających cech diagnostycznych i w związku z tym są coraz częściej opisywane w pracach karpologiczno-systematycznych [29, 45, 68, 69, 71]. Spośród cech mikrostrukturalnych powierzchni nasion i owoców, wzór komórkowy powierzchni (pierwotna skulptura) oraz kutykularna ornamentacja zewnętrznych ścian komórkowych epidermy (wtórna skulptura) są najczęściej specyficzne dla badanego taksonu i stanowią dobre cechy diagnostyczne [6, 7]. Obecnie cechy te są szeroko wykorzystywane w systematyce poszczególnych rodzin u *Angiospermae*. W rodzinie *Apiaceae* szczególnie istotny jest wzór powierzchni owoców oraz układ i urzęźbienie kolców, które wzmacniają różnicowanie taksonów na poziomie rodzaju. W rodzinach *Cactaceae* i *Orchidaceae* szczegóły kutykuli epidermy nasion są tak charakterystyczne, że mogą służyć do identyfikacji roślin. SEM ma również szczególne znaczenie w przypadku nasion i owoców bardzo drobnych lub o powierzchniach wykazujących na pierwszy rzut oka jednolity plan budowy (gatunki blisko spokrewnione, odmiany danego gatunku). W takich rodzinach, jak *Aizoaceae*, *Apocynaceae*, *Ascle-*

*piadaceae*, *Bignoniaceae*, *Euphorbiaceae*, *Valerianaceae* czy *Winteraceae* struktura epikutularnego wosku (trzeciorzędowa skulptura) może mieć duże znaczenie taksonomiczne.

Stosowanie więc mikroskopu skaningowego w badaniach karpologicznych umożliwia uzyskanie cennych danych o budowie powierzchni tych organów. Zróżnicowanie mikrostrukturalne nasion i owoców w pewnych grupach systematycznych *Angiospermae* może stanowić ważne kryterium taksonomiczne [65].

#### LITERATURA

- [1] ANDERSON T. F. 1951. Techniques for the preservation of three - dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope, *Trans. N. Y., Acad. Sci. Ser. II*, **13**: 130.
- [2] AMELUNXEN F., MORGENROTH K., PICKSAK T. 1967. Untersuchungen an der Epidermis mit dem Stereoscan-Elektronen - mikroskop. *Z. Pflanzenphysiol.* **57**: 79-95.
- [3] BAGCHI G. D., TRIPATHI R. 1986. Scanning electron microscopic on some medicinally important seeds of *Papilionaceae*. *Geophytology* **16**: 122-128.
- [4] BAKER E. A., HOLLOWAY P. J. 1971. SEM of waxes on plant surfaces. *Micron* **2**: 364-380.
- [5] BAKER D. M., MINOR M. C., CUMBIE B. G. 1987. Scanning electron microscopy examination of soybean testa development. *Can. J. Bot.* **65**: 2420-2424.
- [6] BARTHOLOTT W. 1981. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nord. J. Bot.* **1**: 345-355.
- [7] BARTHOLOTT W. 1984. Microstructural features of seed surface. *Systematics Association* **25**: 95-105.
- [8] BARTHOLOTT W., WOLLENWEBER E. 1981. Zur Feinstruktur, Chemie und taxonomischen Signifikanz epicuticularer Wasche und ähnlicher Sekrete. *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* **32**: 1-67.
- [9] BEHNKE H.-D. 1981. Ultrastructure and systematics of seed plants. *Nord. J. Bot.* **1**: 341-460.
- [10] BOESEWINKEL F. D., BOUMAN F. 1984. The seed: structure. W: B. M. JOHRI. (ed.), *Embryology of Angiosperms*. Springer Verlag, Berlin, s. 567-610.
- [11] BONE Q., DENTON E. J. 1971. The osmotic effects of electron microscope fixatives. *J. Cell Biol.* **49**: 571-581.
- [12] BOUMAN F., DE LANGE A. 1983. Structure, micro-morphology of *Begonia* Seeds. *The Begonian* **50**: 70-78.
- [13] BRISSON J. D., PETERSON R. L. 1977. The scanning electron microscope and x-ray microanalysis in the study of seeds: a bibliography covering the period of 1967-1976 *Scan. Electr. Microsc.* **2**: 697-712.
- [14] CIECIURA L. 1989. Techniki stosowane w mikroskopii elektronowej. PWN, Warszawa, ss. 153.
- [15] COHEN A. L., 1979. Critical point drying - principles

- and procedures. *SEM* (1979) II, *SEM Inc., AMF O" Hare, IL 60666*: 303–323.
- [16] COLE G. T., BEHNKE H.-D. 1975. Electron microscopy and plant systematics. *Taxon* **24**: 3–15.
- [17] CORNER E. J. H. 1976. The seeds of Dicotyledons, 1. University Press, Cambridge, ss. 311.
- [18] DAHLGREN R. 1983. General aspects of angiosperm evolution and macrosystematics. *Nord. J. Bot.* **3**: 119–149.
- [19] DENEÉ P. B., WALKER E. R. 1975. Specimen coating techniques for the SEM – a comparative study. *SEM* (1975), *IIT Research Institute, Chicago, IL 60616*: 225–232.
- [20] ECHLIN P. 1975. Sputter coating techniques for scanning electron microscopy. *SEM* (1975), *IIT Research Institute, Chicago, IL 60616*: 217–224.
- [21] EHLE R., BARTHLOTT W. 1978. Die epicuticulare Skulptur der Testa – Zellwände einiger *Mesembryanthemaceae*. *Bot. Jahrb. Syst.* **99**: 329–340.
- [22] FALK R. H. 1980. Preparation of plant tissues for SEM. *Scan. Electr. Microsc., II SEM Inc., AMF O" Hare, Chicago, IL 60666*: 79–87.
- [23] FAUST W. Z., JONES S. B., Jr. 1973. The systematic value of trichome complements in the North American group of *Vernonia* (*Compositae*). *Rhodora* **75**: 517–528.
- [24] FREDERICK P. S., SCHMID W. E., MATTEN L. C. 1986. An improved method of preparing *Arabidopsis* specimens for scanning electron microscope examination. *Arab. Inf. Serv.* **24**: 49–56.
- [25] GESSINGER H. D. 1976. Intermicroscopy (LM, SEM, TEM) correlation. W: M. A. HAYAT. (red.), *Principles and techniques of scanning electron microscopy, Biol. Applications*, Van Nostrand Reinhold, New York, ss. 94.
- [26] GOOD N. E., WINGET G. D., WINTER W., CONNOLY T. N., IZAWA S., SINGH R. M. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochem.* **5**: 467–577.
- [27] GRZESIUK S., KULKA K. 1981. Fizjologia i biochemia nasion. PWRiL, Warszawa, ss. 606.
- [28] GUNN C. R. 1982. Seed topography in the *Fabaceae*. *Seed Sci. Technol.* **9**: 737–757.
- [29] GUNN C. R. 1984. Fruits and seeds of genera in the sub-family *Mimosoideae* (*Fabaceae*). *Techn. Bull.* **1681**: 1–194.
- [30] HAYAT M. A. 1978. Introduction to biological scanning electron microscopy. University Park Press, Baltimore, ss. 321.
- [31] HEYWOOD V. H. 1974. Taksonomia roślin. PWN, Warszawa, ss. 111.
- [32] HODGKIN N. M. 1972. Electron scanning microscopy of biological material – comparative technique. *Microstructures* **3**: 17.
- [33] HOLLAND V. F. 1976. Some artifacts associated with sputter coated samples observed at high magnifications in the scanning electron microscope. *SEM* (1976) I, II *Research Institute, Chicago, IL 60616*: 71–74.
- [34] HOWARD K. S., POSTEK M. T. 1979. Dehydration of scanning electron microscopy specimens – a bibliography. *SEM* (1979) II, *SEM Inc., AMF O" Hare, IL 60666*: 892–902.
- [35] IDLE D. 1971. Preparation of plant material for scanning electron microscopy. *J. Microsc.* **93**: 77–79.
- [36] JAHSA S. S., PANDEY A. K. 1989. Seed coat structure in *Melilotis* (*Fabaceae*). *Phytomorph.* **39** (23): 221–229.
- [37] JEFFREE C. E., BAKER E. A., HOLLOWAY P. J. 1975. Ultrastructure and recrystallization of plant epicuticular waxes. *New. Phytol.* **75**: 534–549.
- [38] JOHNSON V. E. 1976. The scanning electron microscopy in biology: a bibliography. *Scan. Electr. Microsc.* **1**: 637–700.
- [39] JONES D. A., WILKINS D. A. 1977. Zmienność i przystosowanie roślin. PWN, Warszawa, ss. 210.
- [40] KAHN L. E., FROMMES S. P., CANCELLA P. A. 1977. Comparison of ethanol and chemical dehydration methods for the study of cells in culture by scanning and transmission microscopy. *SEM* (1977), *III Research Institute, Chicago, IL 60616*: 501–506.
- [41] KAPIL R. N., BOR J., BOUMAN F. 1980. Seed appendages in Angiosperms. I. Introduction. *Bot. Jahrb. Syst.* **101**: 555–573.
- [42] KARCZ J., TOMCZOK J. 1987. Microstructural features of seeds surface in 6 species of the genus *Nigella L.* (*Ranunculaceae*). *Acta Biol. Sil.* **7** (24): 111–124.
- [43] KEIJZER CH. J. 1993. A microtome for sectioning Critical Point Dried tissues for SEM. *J. Electron Microsc.* **41**: 124–125.
- [44] KENNEDY J. R., WILLIAMS R. W., GRAY J. P. 1989. Use of peldri II (a fluorocarbon solid at room temperature) as an alternative to Critical Point Drying for biological tissues. *J. EM Technique* **11**: 117–127.
- [45] KLIPHUIS E., HERINGA J., HOGEWEG P. 1986. Cytotaxonomic studies on *Galium palustre L.* Morphological differentiation of diploids, tetraploids and octoploids. *Acta Bot. Neerl.* **35** (4): 383–392.
- [46] KOZŁOWSKI T. T., GUNN C. R. 1972. Importance and characteristic of seeds. W: T. T. KOZŁOWSKI (red.), *Seed biology*, I. Acad. Press N. Y., London, s. 1–20.
- [47] LERSTEN N. R. 1982. Tracheid bar and vested pits in legume seeds (*Leguminosae: Papilionoideae*). *Amer. J. Bot.* **69**: 98–107.
- [48] MAKITA T., SANDBORN E. B. 1971. Identification of intracellular components by scanning electron microscopy. *Expl. Cell. Res.* **67**: 211.
- [49] MARTIN A. C. 1946. The comparative internal morphology of seeds. *Amer. Midland Nat.* **36**: 513–600.
- [50] MC DONALD L. M., PEASE R. T. W., HAYES T. L. 1967. Scanning electron microscopy of sectioned tissue. *Lab. Invest.* **16**: 532.
- [51] MERSEY B., MCCULLY M. E. 1978. Monitoring of the course of fixation of plant cells. *J. Microsc.* **114**: 49–76.
- [52] NETOLITZKY F. 1926. Anatomie der Angiospermen-Samen. W: K. LINSBAUER (red.), *Handbuch der Pflanzenanatomie unter Mitwirkung zahlreicher Fachmänner*, 10. Gebruder Borntraeger, Berlin, s. 1–364.
- [53] OLSEN O.-A. 1974. Genetics and ultrastructure of the barley line „Hiproly”. *Hereditas* **77**: 287.
- [54] PANNESSA B. J., GENNARO J. F., Jr. 1974. Intracellular

- structures. W: M. A. HAYAT (red.), *Principles and practice of scanning electron microscopy*, I. Van Nostrand Reinhold Co., New York, s. 226–241.
- [55] PARSONS E. B., BOLE D. J., THOMAS W. D. E. 1974. A comparative survey of techniques for preparing plant surfaces for the scanning electron microscope. *J. Microsc.* **101**: 59–75.
- [56] POMERANZ Y. 1973. Structure and mineral composition of cereal aleurone cells as shown by scanning electron microscopy. *Cereal Chem.* **50**: 504.
- [57] ROBINSON V. N. E. 1978. The SEM examination of wet specimens. *Scanning* **1**: 149–156.
- [58] SCHIFF R. I., GENNARO JR, J. F. 1979. The influence of the buffer on maintenance of tissue lipid in specimens for scanning electron microscopy. *SEM (1979) III, SEM, Inc., AMF O" Hare, IL 60666*: 449–458.
- [59] SERRATO VALENTI L., MELONE M., BOZZINI A. 1989. Comparative studies on testa structure of hard seeded and soft – seeded varieties of *Lupinus angustifolius* L. (*Leguminosae*) and on mechanisms of water entry. *Seed Sci. Technol.* **17**: 563–581.
- [60] STACE C. A. 1965. Cuticular studies as an aid to plant taxonomy. *Bull. Brit. Mus.* **4**: 1–78.
- [61] STACE C. A. 1993. Taksonomia roślin i biosystematyka. PWN, Warszawa, ss. 340.
- [62] STEEVES T. A. 1983. The evolution and biological significance of seeds. *Can. J. Bot.* **61**: 3550–3560.
- [63] STEVENS D. J. 1973. The aleurone layer of wheat. III. Isolation and scanning electron microscopy examination of the layer and of its component parts. *J. Sci. Food Agric.* **24**: 307.
- [64] THEOBALD W. L., KRAHULIK J. K., ROLLINS R. C. 1979. Trichome description and classifications. W: C. R. METCALFE, R. CHALK (red.), *Anatomy of Dicotyledones*, I. Clarendon Press, Oxford, s. 40–55.
- [65] TOBE H., WAGNER W. L., CHIN H. 1987. A systematic and evolutionary study of *Oenothera* (*Onagraceae*): Seed coat anatomy. *Bot. Gaz.* **148**: 235–257.
- [66] TORNHILL J. W., MATTA R. K., WOOD W. H. 1965. Examining three-dimensional microstructures with the scanning electron microscope. *Grana Palynologica* **6**: 3–6.
- [67] TUCKER S. C. 1989. Development of the phytomelanin layer in fruits of *Ageratum conyzoides* (*Compositae*). *Amer. J. Bot.* **76** (5): 739–746.
- [68] VARADARAJAN G. S., GILMARTIN A. J. 1988. Seed morphology of the subfamily *Pitcairnioideae* and its systematic implications (*Bromeliaceae*). *Amer. J. Bot.* **75** (6): 808–818.
- [69] VON TEICHMAN I. 1988. Development and structure of the seed coat of *Lansea discolor* (Sonder) Engel. (*Anacardiaceae*). *Bot. J. Linn. Soc.* **96**: 105–117.
- [70] VON TEICHMAN I. 1991. Trends in the evolution of dicotyledonous seeds based on character associations with special reference to pachychalazy and recalcitrance. *Bot. J. Linn. Soc.* **105**: 211–237.
- [71] WAGNER W. L., STOCKHOUSE R. E., KLEIN W. M. 1985. The systematic and evolution of the *Oenothera caespitosa* species complex (*Onagraceae*). *Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard.* **12**: 1–103.
- [72] WEBB M. A., ARNOTT H. J. 1980. A scanning electron microscope study of zucchini seed cotyledons during germination. *Scan. Electr. Microsc.* **3**: 581–590.
- [73] WILKINSON H. P. 1979. The plant surface. W: C. R. METCALFE, L. CHALK (eds.), *Anatomy of Dicotyledones*, I. Clarendon Press, Oxford, s. 97–166.
- [74] WINKLER H. 1939. Versuch eines „natürlichen“ Systems der Früchte. *Beitr. z. Biol. der Pflanz.* **26**: 201–220.