

(Institut für Systematische Botanik und Pflanzengeographie der Universität Heidelberg)

Abtragung biologischer Oberflächen durch hochfrequenz-aktivierten Sauerstoff für die Raster-Elektronenmikroskopie

(Dismantling of Biological Surfaces for Scanning Electron Microscope Examination by Oxydation in High Frequency Gas Discharge)

Von Wilhelm BARTHLOTT¹⁾, NESTA EHLER und Rainer SCHILL

Mit 8 Abbildungen

(Manuskript eingelangt am 20. Oktober 1975)

Zusammenfassung

Der \pm schichtweise Abbau organischen Materials durch Oxydation in einer Hochfrequenzentladung wird anhand von sechs ausgewählten botanischen Objekten dargestellt. Mit REM-Aufnahmen vor und nach der Abtragung wird gezeigt, daß die Methode in bestimmten Fällen wesentlich zur Klärung von Zellwandstrukturen beitragen kann. Das Auftreten von Ätzeffekten ähnlichen Artefakten begrenzt die Untersuchung bei hohen Vergrößerungen.

Summary

A dismantling layer by layer of organic material is possible by oxydation in high frequency gas discharge. Six botanical objects are illustrated before and after the treatment with oxygen by SEM micrographs. It is shown that this method can contribute essentially to make the structure of cell walls accessible for a scanning electron microscope examination. Structure disturbance by etching effects could not be avoided and limit the examination under higher magnifications.

Einleitung

Das Raster-Elektronenmikroskop (REM) bildet vom Arbeitsprinzip her nur die Oberfläche der Untersuchungsobjekte ab. Selbst unmittelbar unter dieser Oberfläche liegende Strukturen sind einer Analyse nicht ohne weiteres zugänglich. Die Darstellung innerer Strukturen ist zwar im optischen Schnitt bei durchstrahlbaren Objekten im Lichtmikroskop möglich, die Untersuchungen sind aber durch die geringe Tiefenschärfe und Auflösung begrenzt. Das TEM erlaubt die Beobachtung

¹⁾ Dr. Wilhelm BARTHLOTT, Institut für Systematische Botanik und Pflanzengeographie der Universität, D-6900 Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 280, BRD.

von Ultradünnschnitten bei höchsten Vergrößerungen, eine räumliche Darstellung ist aber auch hier nicht ohne weitere, meist durch sehr aufwendige Methoden gegeben. Damit ist jeder Versuch, „innere Strukturen eines Körpers durch behutsame Abtragen der äußeren Schichten Schritt für Schritt freizulegen“ (BLASCHKE und SCHUR, 1972) und somit einer REM-Analyse zu erschließen, von großem Interesse. Mit einer solchen Methode wäre es dann z. B. möglich, komplizierte Innenstrukturen mancher Sporenwände bei hohen Vergrößerungen dreidimensional abzubilden.

Eine Abtragung organischer Schichten für elektronenmikroskopische Untersuchungen ist seit langem durch die Ionenätzung möglich. Dabei entstehen allerdings starke Strukturschädigungen, die z. B. vom Einschubwinkel der Ionen abhängen und die Anwendbarkeit dieser Methoden für die Raster-Elektronenmikroskopie stark einschränken (BLASCHKE und SCHUR, 1972; SPREIZER, 1972). Eine wesentlich schonendere Abtragungsmethode ist die sog. „Kalte Verbrennung“, d. h. eine Oxydation durch aktivierten Sauerstoff ohne wesentliche Erhöhung der Temperatur. Erfolgt dabei die Aktivierung in einer durch Hochfrequenz erzeugten Gasentladung, so entstehen Sauerstoff-Ionen, die ohne Anlegen einer Gleichspannung kaum zur Probe hin beschleunigt werden. Kommen die Ionen — der sogenannte „aktivierte Sauerstoff“ — mit der organischen Oberfläche in Berührung, entstehen CO- oder CO₂-Moleküle, die als Gas entweichen. Damit ist ein schichtweiser Abbau möglich, die lokale Abtragungsgeschwindigkeit hängt dabei u. a. von der chemischen Zusammensetzung des Materials ab. Die Methode des Abbaus organischer Substanzen durch hochfrequenzaktivierten Sauerstoff (im folgenden kurz „Hochfrequenzoxydation“ oder „Oxydation“ genannt) wurde am Zentrum für Elektronenmikroskopie Graz/Austria entwickelt (Übersicht bei JAKOPIC, 1960); eine verbesserte Apparatur von ALDRIAN *et al.* (1967) vorgestellt. Biologische Oberflächen hat man unseres Wissens mit dieser Methode noch nicht genauer untersucht; ihre Anwendbarkeit für die Raster-Elektronenmikroskopie soll im folgenden anhand botanischer Objekte gezeigt werden.

Material und Methoden

I. Material

Untersucht wurden die Oberflächen frischer Blatt- und Sproßepidermen von Gymno- und Angiospermen; Samenoberflächen einiger Angiospermen; Fichtenholz; das *Velamen radicum* der Luftwurzeln von vier Orchideenarten; acetolysierter Pollen von *Asteraceae* und *Cactaceae* sowie Pollinienoberflächen von *Orchidaceae*. Aufgrund längerer REM-Erfahrung an botanischen Objekten wurden dabei bevorzugt solche Zellwandstrukturen für eine Untersuchung ausgewählt, bei denen ein schichtweiser Abbau der Oberflächen wesentliche Einblicke in das Wandgefüge versprach. Die genauer untersuchten Arten werden im folgenden Kapitel besprochen. Die Objekte wurden für die weitere Präparation und REM-Untersuchung mit Leitsilber bzw. Tesafilm auf Al-Probesteller aufgebracht.

II. Hochfrequenzaktivierte Oxydation

Die Oxydation wurde mit der am Zentrum für Elektronenmikroskopie Graz entwickelten Gasentladungsapparatur GEA 004-S durchgeführt. Die Sauerstoffatmosphäre des Rezipienten wurde mit einem Leybold-Heraeus EPA 100-Pumpenstand auf ca. 10⁻³ Torr verdünnt. Die Hochfrequenz der Gasentladungsapparatur beträgt 27,125 MHz bei einer Ausgangsleistung von 40 Watt. Die Präparate wurden dem aktivierten Sauerstoff zwischen 5 und 60 min. ausgesetzt.

III. Metallbeschichtung und Raster-Elektronenmikroskopie

Sowohl die frischen als auch die hochfrequenzoxydierten Präparate wurden im Sputtering-Verfahren in einer verdünnten Argon-Atmosphäre mit Gold beschichtet (Kontrastiereinrichtung der Fa. Leitz). Die REM-Untersuchung erfolgte in einem Cambridge Stereoscan S 600 bei Beschleunigungsspannungen von 7,5 und 15 kV; fotografiert wurde mit der angeschlossenen Fotoautomatik. Die Aufnahmen 7b und 7c wurden mit einem REM Cambridge MK II A gemacht.

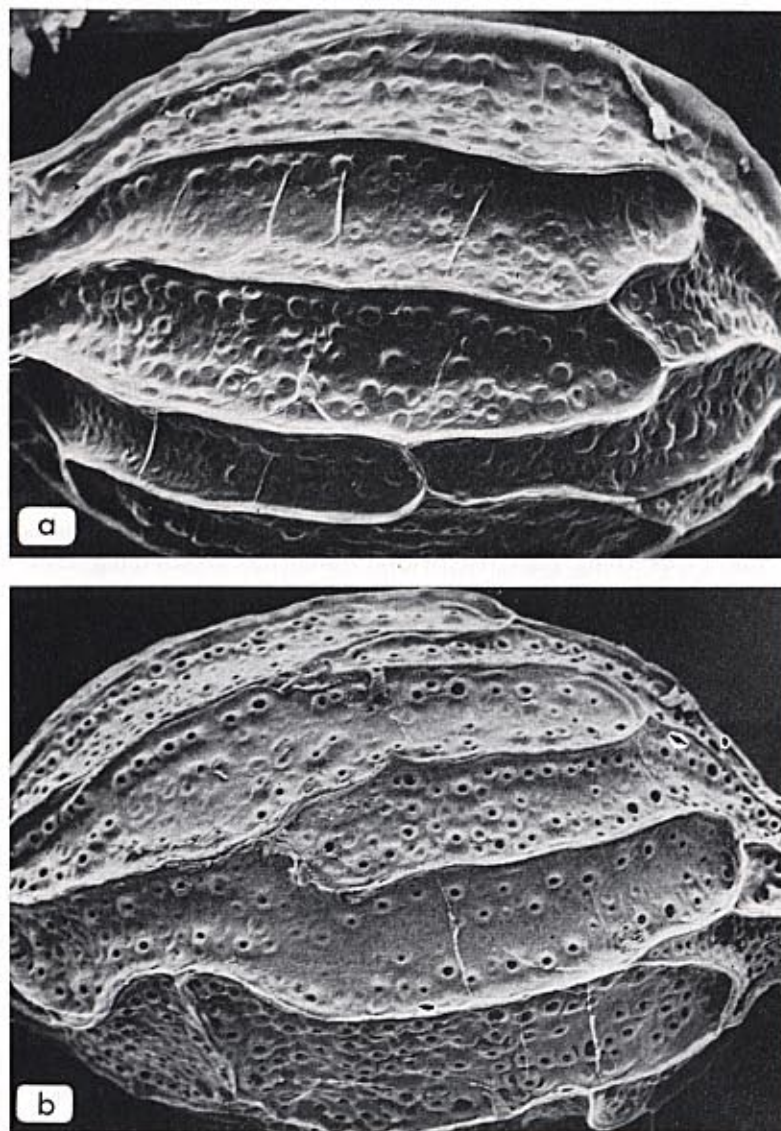


Abb. 1. Samen von *Pterospora andromeda* Nutt. (*Pyrolaceae*); a) un behandelter Samen, b) nach 30 min. Hochfrequenzoxydation; Vergr. 300:1.

Ergebnisse und Diskussion

Bei allen untersuchten Präparaten wurde nach der Hochfrequenzoxydation eine strukturelle Veränderung der Oberfläche beobachtet. Abhängig von der Beschaffenheit des Materials und Zeitdauer der Behandlung, reicht die Skala dabei von einer feinen Artefakt-Granulation bis hin zur völlig abgetragenen Zellwand. Als sehr schwach angreifbar erwies sich z. B. Cutin, gut dagegen wurde Zellulose abgebaut.

Die nordamerikanische Pyrolaceae *Pterospora andromeda* NUTT. besitzt winzige Staubsamen, die raster-elektronenmikroskopisch genauer von RAUH *et al.* (1975) beschrieben wurden. Auf der Testa finden sich ringförmige bis beinahe kraterartige Wandstrukturen (Abb. 1a), deren Natur nicht ohne weiteres erklärbar ist. Lichtmikroskopische Untersuchungen deuten darauf hin, daß es sich um tüpfelartige Perforationen der inneren Periklinalwand der Testa handeln könnte, die von der membranartig dünnen periklinalen Außenwand überdeckt werden. Bruchstellen der Samenschale ergaben auch im REM keinen weiteren Aufschluß. Nach 30 min. Oxydation ist die äußere Periklinalwand weitgehend abgetragen (Abb. 1b) und man erkennt nun, daß es sich um von einem Ringwulst umgebene Perforationen der inneren Periklinalwand handelt. Eine Beobachtung dieser Wanddurchbrüche bei höheren Vergrößerungen ergibt wegen der von der relativ langen Behandlung herrührenden Oberflächengranulation keine weiteren Informationen. Diese Granulation der Oberfläche ist eine für die Hochfrequenzoxydation typische Pseudostruktur. Sie erinnert stark an die von der Ionenätzung her bekannten Effekte. Abb. 2 zeigt bei 6000facher Vergrößerung einen Ausschnitt aus der Oberfläche einer Blattepidermiszelle von *Ficus elastica* ROXB. (*Moraceae*), die zur Hälfte während der Oxydation durch einen dünnen Film abgedeckt (links), zur anderen Hälfte etwa 30 min. vom Sauerstoff angegriffen worden war (rechts). Während die unbehandelte *Cuticula* von *Ficus* völlig glatt ist, wurde durch die Behandlung keine saubere Abtragung erreicht, sondern die oben erwähnte Pseudostruktur (Abb. 2 rechts).

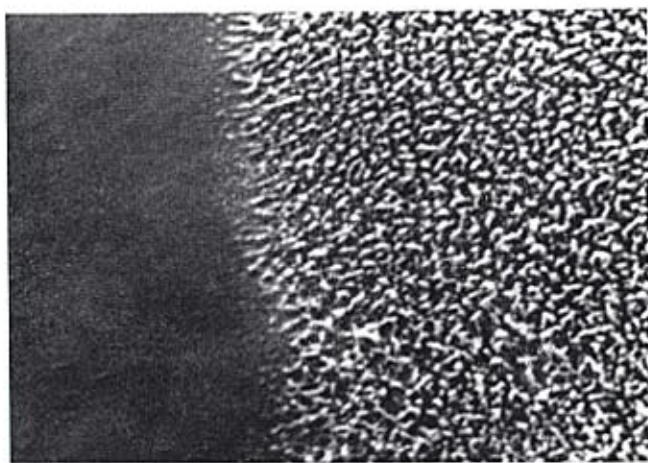


Abb. 2. Oberfläche einer Blattepidermiszelle von *Ficus elastica* ROXB. (*Moraceae*) bei 6000facher Vergrößerung. Links im Bild die glatte, unbehandelte *Cuticula*; rechts die für die Hochfrequenzoxydation an botanischen Oberflächen typische feingranulöse Artefaktstruktur. Weitere Erklärung im Text.

Bei den Luftwurzeln von *Oncidium stacyi* GARAY (*Orchidaceae*) sind alle Rhizodermiszellen papillenartig ausgezogen. Die Wände dieser Haare sind im REM-Bild (Abb. 3a) glatt und unstrukturiert. Erst der Schnitt zeigt, daß sie leistenartige Wandverstärkungen auf der Innenseite tragen (BARTHLOTT und CAPEIUS, 1976). Nachdem die Rhizodermis etwa 30 min. oxydiert wurde, läßt sich der toridierte Verlauf der inneren Wandleisten raster-elektronenmikroskopisch darstellen (Abb. 3b). Das *Velamen radicum* der Orchideen sowie die ähnlich strukturierte Testa mancher Orchideensamen erweisen sich als besonders geeignet für diese Methode. Schneidet man das ausdifferenzierte *Velamen* von *Dendrobium suberbum* REICHB. f. quer, so erkennt man ein regelmäßiges Leistennetz (Abb. 4a), das nach dem Abbau der Zwischenbezirke durch Oxydation (Abb. 4b) genauer dargestellt werden kann. Ein besonders klares Beispiel für Strukturaufklärung durch den Wandabbau kann am *Velamen* von *Catasetum russellianum* HOOK. demonstriert werden. Die Wand einer intakten Zelle (Abb. 5a) zeigt im REM geschwungene, einfach bis gabelig verzweigte Leisten und membranartig gespannte Zwischenleistenbezirke, in denen große Wanddurchbrüche liegen. Ähnliche Wandstrukturen sind bei *Ansellia gigantea* REICHB. f. mit anderen Methoden gefunden und analysiert worden (NOEL, 1974). Im lichtmikroskopischen Bild erscheint die Zellwand dagegen netzartig strukturiert, in der älteren Literatur werden die Leisten auch mehrfach als „netzartig miteinander verbunden“ beschrieben. Der tatsächliche Verlauf der Wandverdickungen läßt sich nach Abbau der Zwischenleistenbezirke darstellen. Es zeigt sich nunmehr (Abb. 5b), daß die Leisten auf Vorder- und Rückseite der gleichen Zellwand unabhängig voneinander verlaufen; sie überkreuzen sich dabei und ergeben dann das bei der Durchstrahlung im Lichtmikroskop beobachtete Netzmuster.

Bei der Untersuchung komplexer, tectater Pollen ergibt sich ein weiterer Anwendungsbereich innerhalb der Botanik. Hier lassen sich aber auch deutlich die durch Artefaktbildung limitierten Grenzen der Methode aufzeigen. Als Objekt wurde der acetolysierte Pollen von *Rhipsalidopsis guertneri* (REGEL) MORAN (*Cactaceae*) gewählt. Der Bruch durch die *Exine* (Abb. 6) zeigt die Stratifikation in *Nexine*, *Bacula* und *Tectum*, letzteres mit supratectalen *Spinulae* und von einem feinen Ringwall umgebenen Punkturen. Die Abb. 7a zeigt die Aufsicht auf das intakte *Tectum*; Abb. 7b und 7c einen jeweils senkrecht zur Hochfrequenzquelle liegenden Ausschnitt aus der *Exine* nach 15 bzw. 30 min. Oxydation. Nach 15 min. erkennt man die feine Artefakt-Granulation der *Exine*oberfläche (Abb. 7b), das *Tectum* ist schon teilweise abgetragen, die ursprünglich sauber begrenzten Punkturen sind stark vergrößert. Nach 30 min. (Abb. 7c) ist das *Tectum* weitgehend abgetragen und man blickt nunmehr auf die freien *Bacula*. Die Abb. 8 gibt den Abtragungsvorgang schematisch wieder. Dargestellt ist jeweils ein Pollenkornsektor im Schnitt, die Pfeile geben die Richtung zur Hochfrequenzquelle an. In Abb. 8a ist die unbehandelte *Exine*, in Abb. 8b und 8c die Pollenwand entsprechend nach 15 bzw. 30 min. Oxydation dargestellt. An den kugligen Pollenkörnern läßt sich zeigen, daß der Abbau der Wand von ihrer Lage zur Hochfrequenzquelle abhängt. Es werden demnach auch genügend beschleunigte Ionen erzeugt, die eine vom Einfallswinkel abhängige Strukturschädigung bewirken (SPREIZER, 1972). Ein \pm schichtweiser Abbau erfolgt nur an den Stellen, an denen durch ihre senkrechte Lage zur Hochfrequenzquelle die Ionen senkrecht auftreffen. Am Rande der Pollen entstehen durch die tangentielle Abtragung verstärkt Pseudostrukturen, wie sie

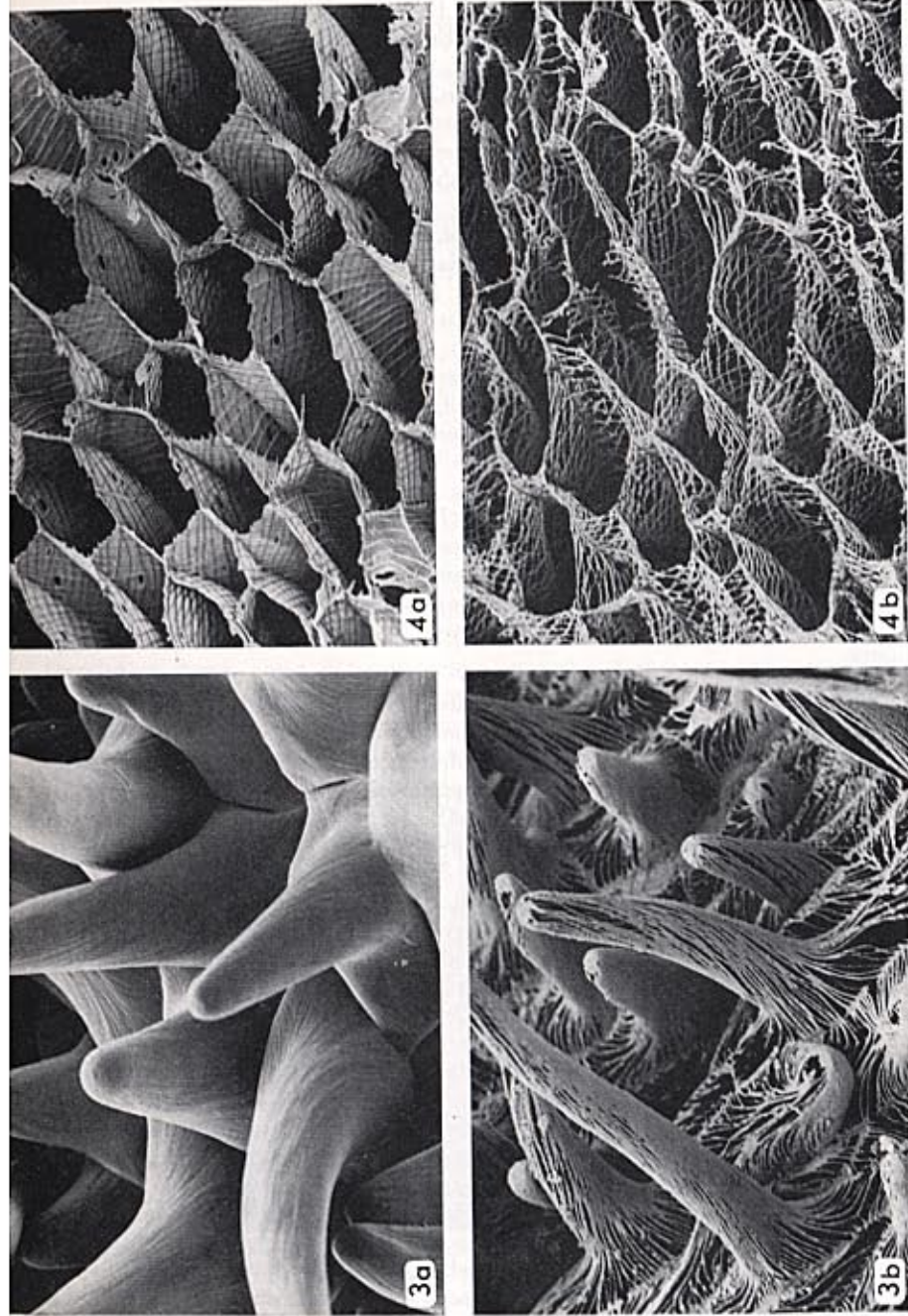


Abb. 3. Oberfläche der Luftwurzel von *Oeclitium stacyi* Garay (Orchidaceae); a) unbelandete, frische Rhizodermis, b) nach 30 min. Oxydation; Vergr. 300:1.

Abb. 4. Schnitt durch das Velamen radicium der Luftwurzel von *Dendrobium suberbum* Reichb. f. (Orchidaceae); a) unbelandete, b) nach 30 min. Oxydation; Vergr. 300:1.

durch schrägen Ionenbeschuß z. B. von VAHL *et al.* (1972) an Dentin erzeugt wurden. Trotz der gezeigten Einschränkungen könnte eine Verfeinerung der Methode der Hochfrequenzoxydation speziell für die Palynologie von Interesse sein.

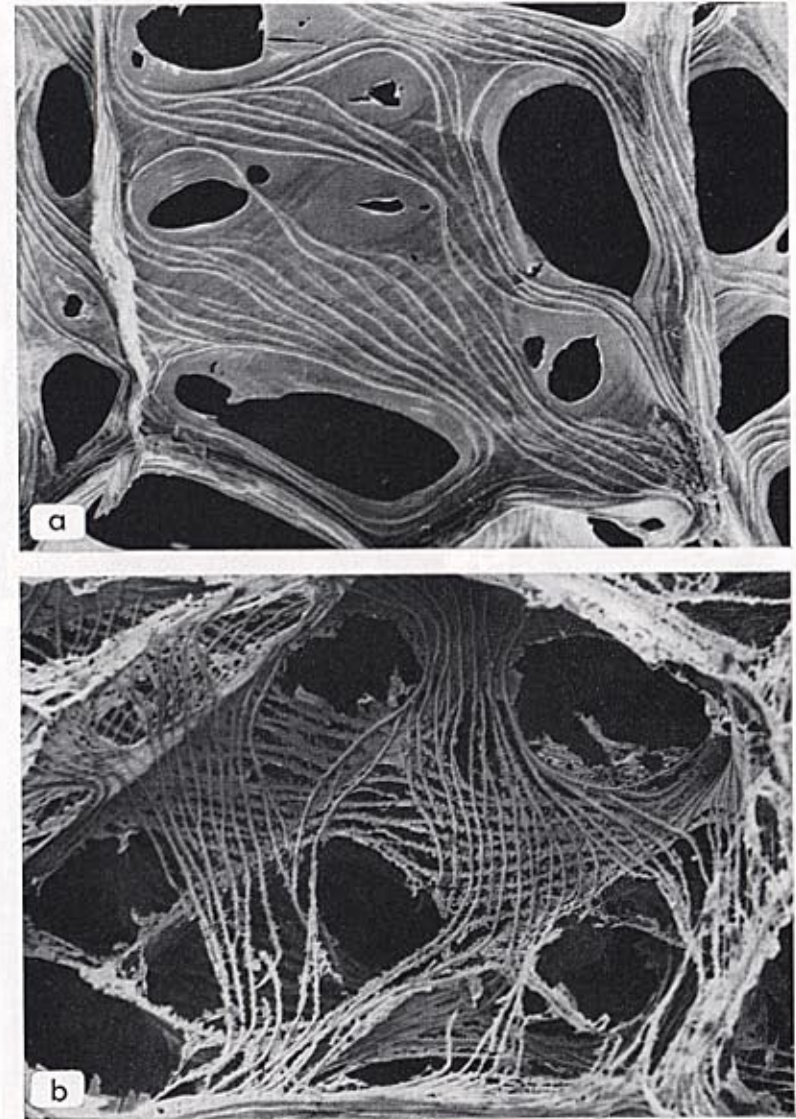


Abb. 5. Wand einer einzelnen Zelle aus dem Velamen radicium von *Cattasetum russellianum* Hook. (Orchidaceae); a) die unbelandete Zellwand mit den einfach bis gabelig verzweigten Verstärkungsleisten und großen Perforationen der Zwischenleistenbezirke. b) Nach 20 min. Oxydation ist die membranartig dünne Zellwand abgebaut. Das Gerüst der unabhängig voneinander verlaufenden Leisten auf Vorder- und Rückseite der gleichen Wand sind erhalten, ihr Verlauf kann nunmehr genau analysiert werden. Vergr. 660:1.

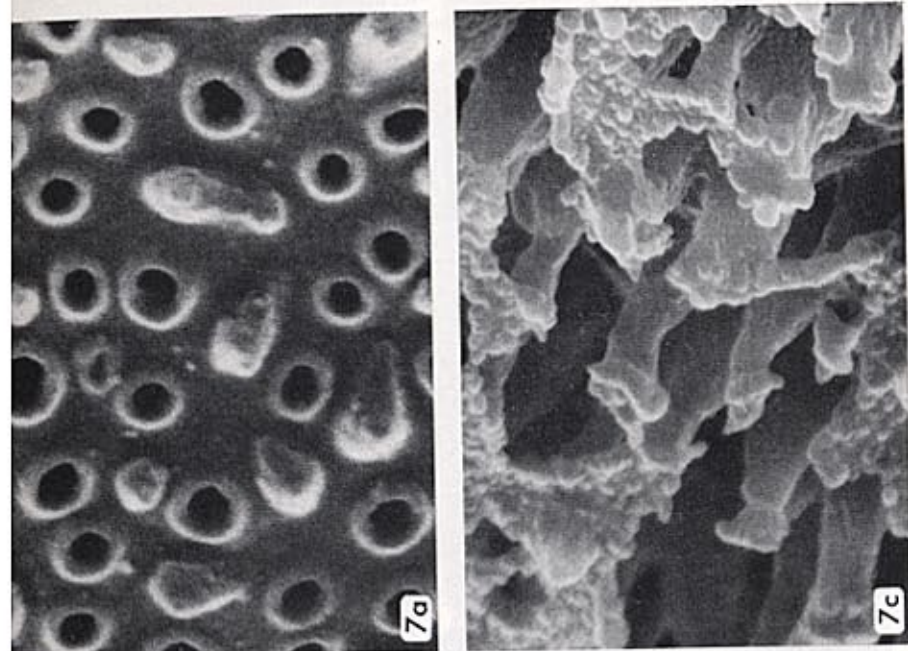


Abb. 7. Aufsicht auf die Exine von *Rhipsalidopsis gaertneri* (Regel) Moran (Cactaceae). a) acetolyzierter Pollen; b) acetolyzierter Pollen nach 30 min. Oxydation. Vergr. 9000:1.

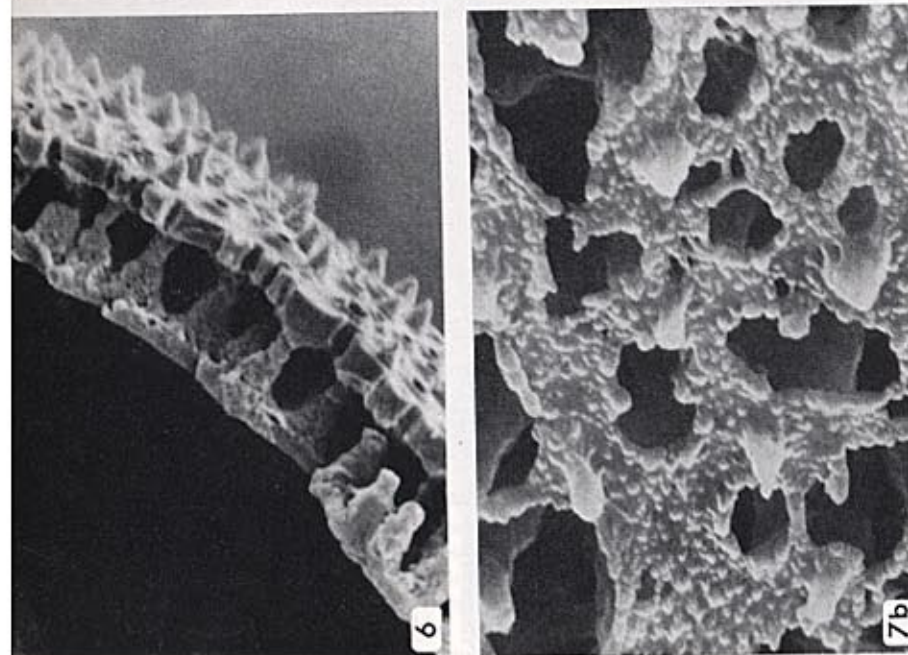


Abb. 6. Bruch durch die Exine des Pollens von *Rhipsalidopsis gaertneri* (Regel) Moran (Cactaceae). Man erkennt die Stratifibration in Pectum, Bacula und Narine. Vergr. 5000:1.

Abb. 7. Aufsicht auf die Exine von *Rhipsalidopsis gaertneri* (Regel) Moran (Cactaceae). a) acetolyzierter Pollen; b) acetolyzierter Pollen nach 30 min. Oxydation. Vergr. 9000:1.

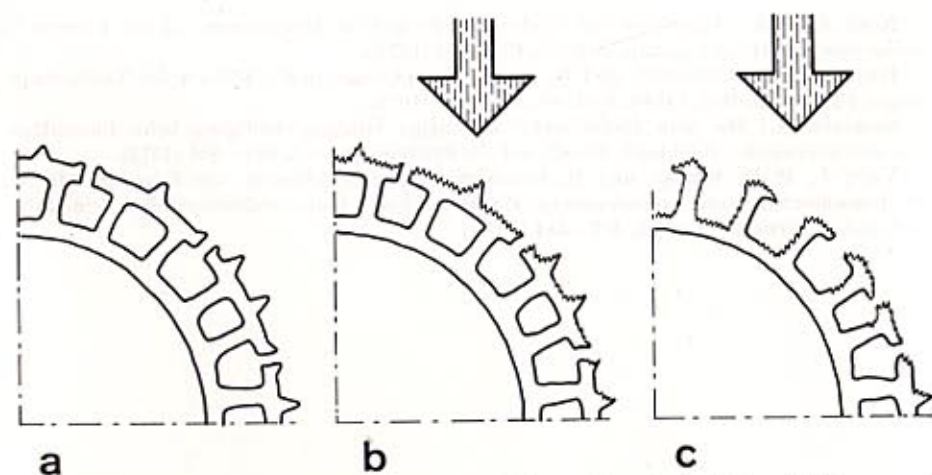


Abb. 8. Schichtweiser Wandabbau eines tectaten Pollens, schematisch. Weitere Erklärungen im Text.

Über die Bedeutung des oxydativen Abbaus biologischer Oberflächen für die Raster-Elektronenmikroskopie lassen sich aufgrund dieser beschränkten Versuche noch keine endgültigen Aussagen machen. In einigen der hier vorgestellten Fälle war mit dieser präparativ nicht aufwendigen Methode eine eindeutige Strukturauflösung möglich. Bei der Untersuchung bestimmter Zellwandtypen wird sich der Abbau mit aktiviertem Sauerstoff vermutlich als unentbehrlich erweisen.

Dank

Die raster-elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützten Programms durchgeführt werden. Gedankt für technische Hilfe sei der Cambridge Instrument Company G. m. b. H. (Dortmund), die die Gasentladungsapparatur zur Verfügung stellte, und Herrn Ing. A. ALDRIAN (Graz). Dank für wertvolle Hinweise zur Auswahl und Überlassung des teilweise selbst gesammelten Untersuchungsmaterials schulden wir dem Direktor des Instituts für Systematische Botanik und des Botanischen Gartens Heidelberg, Herrn Prof. Dr. Werner RAUH.

Literatur

- ALDRIAN A., E. JAKOPIĆ, O. REITER und R. ZIEGELBECKER: Eine Apparatur zur Anwendung von Hochfrequenz und Gleichspannungsentladung. *Radex-Rundschau* 2, 510—522 (1967).
- BARTHOLOTT W. und I. CAPESIUS: Mikromorphologische und funktionelle Untersuchungen am *Velamen radicum* der Orchideen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 88, 3 (1976) (im Druck).
- BLASCHKE R. und K. SCHUR: Bedeutung der Ionenstrahlätzung für die Gefügedarstellung im Raster-EM und Photoemissions-EM. *Beitr. elektronenmikr. Direktabb. Oberfl.* (ed. G. PFEFFERKORN) 5, 565—576 (1972).
- JAKOPIĆ E.: Eine Methode zum Anätzen, schichtweisen Abbau und Verbrennen organischer Substanzen mittels aktiviertem Sauerstoff. *Proceed. Europ. Reg. Conf. Electron Microscopy* (ed. HOUWINK A. L. and B. J. SPIT), Delft, 1, 559—563 (1960).

NOEL A. R. A.: Aspects of Cell Wall Structure and the Development of the *Velamen* in *Ansellia gigantea* REICHB. f. Ann. Bot. 38, 495—504 (1974).

RAUH W., W. BARTHOLOTT und N. EHLEK: Morphologie und Funktion der Testa staubförmiger Flugsamen. Bot. Jahrb. Syst. 96, 353—374 (1975).

SPREIZER H.: Die vom Einfallswinkel abhängige Strukturschädigung beim Ionenätzen. Beitr. elektronenmikr. Direktabb. Oberfl. (ed. G. PFEFFERKORN) 5, 555—564 (1972).

VAHL J., H.-D. MIERAU und H. OECHSNER: Reliefdarstellungen von Zahndünnschliffen nach Ionenbeschuß unter verschiedenen Einfallswinkeln. Beitr. elektronenmikr. Direktabb. Oberfl. (ed. G. PFEFFERKORN) 5, 577—584 (1972).