©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Austria)	**Vol. 27**	Fasc. 2	299–309	30. 11. 1987

Aus dem Institut für Pflanzenphysiologie der Karl-Franzens-Universität Graz

Substanzverluste und Strukturerhaltung im Verlauf einer „trockenen" Einbettung für die Elektronenmikroskopie[1])

Von

Georg HEINRICH*), Walter WELZ*) und Thomas SAWIDIS**)

Mit 3 Abbildungen

Eingelangt am 13. März 1987

Key words: Fixation (electron microscopy), dry embedding, loss of substances, fine structure preservation, nectaries, *Euphorbia pulcherrima*.

Summary

HEINRICH G., WELZ W. & SAWIDIS TH. 1987. Loss of substances and structure preservation in the course of "dry" embedding procedure for electron microscopy. – Phyton (Austria) 27 (2): 299–309, 3 figures. – German with English summary.

Nectaries of *Euphorbia pulcherrima,* fed with D-glucose-^{14}C or L-leucine-^{14}C, were fixed in different ways, dehydrated by steps of ethanol or acetone and embedded in Epon. The losses of radioactive substances during different electron microscopic preparation schedules were determined by means of liquid scintillation counting. These losses were compared with the extracted radioactivity in the course of a "dry" embedding technique. The preservation of the fine structure seems to bee sufficient for high resolution radioautography of water-soluble substances.

Zusammenfassung

HEINRICH G., WELZ W. & SAWIDIS TH. 1987. Substanzverluste und Strukturerhaltung im Verlauf einer „trockenen" Einbettung für die Elektronenmikroskopie. – Phyton (Austria) 27 (2): 299–309, mit 3 Abbildungen. – Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

---

[1]) Mit Unterstützung des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

*) Univ.-Prof. Dr. Georg HEINRICH, Dr. Walter WELZ, Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Graz, Schubertstraße 51, A-8010 Graz, Österreich.

**) Thomas SAWIDIS, Botanisches Institut der Universität Thessaloniki, GR-54006 Thessaloniki, Griechenland.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Nektarien von *Euphorbia pulcherrima,* die mit D-Glucose-^{14}C und L-Leucin-^{14}C gefüttert waren, wurden unterschiedlich fixiert und nach Entwässerung mit Äthanol bzw. Aceton in Epon eingebettet. Die im Verlauf der verschiedenen Fixierungen, Entwässerungen und der Einbettung auftretenden Extraktionsverluste wurden mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers gemessen und mit jenen Extraktionsverlusten verglichen, die eine „trockene" Einbettung mit sich bringt. Die Verluste an wasserlöslichen Substanzen sind gering und die Erhaltung der Feinstruktur erscheint nach dieser Einbettung ausreichend gut, um Hochauflösungsautoradiographie durchzuführen.

1. Einleitung

Die Lokalisation radioaktiv markierter wasserlöslicher Moleküle mit Hilfe von Autoradiographie oder von Ionen mit Hilfe von Röntgenmikrosonden bzw. dem Laser Microproben Massenanalysator „LAMMA" (HEINEN & al. 1978, HEINRICH 1984) erfordert Präparationsmethoden, die möglichst geringe Substanzverluste mit sich bringen. Weitere Forderungen an die Methode sind ausreichende Feinstrukturerhaltung und eine möglichst geringe Verlagerung kleinmolekularer Substanzen. Neben der Kryo-Ultramikrotomie (BERNHARD & LEDUC 1969, CHRISTENSEN 1969, WERNER & al. 1973, KIND & KRIEG 1973, SITTE 1969), Fällungsmethoden (PLATTNER 1973, LORCH & SCHÄRFER 1981) und der Gefriersubstitution (STEINBISZ 1978, HEATH & al. 1985, HIPPE 1985) bietet sich eine weitere Technik an, um Verluste wasserlöslicher Substanzen aus Geweben gering zu halten. Nach FRITZ & ESCHRICH (1970) werden schockgefrorene Gewebe gefriergetrocknet, in Paraformaldehyddämpfen fixiert und nach Vakuuminfiltration über Xylol in Durcupan eingebettet. Der Einbettungsprozeß ist zwar langwierig, eröffnet aber die Möglichkeit, radioaktiv markierte wasserlösliche Substanzen in pflanzlichen Geweben zu lokalisieren. Die im Verlauf dieser Methode auftretenden Verluste radioaktiv markierter Substanzen werden mit jenen verglichen, die bei den konventionellen Fixierungs- und Einbettungsverfahren auftreten. Außerdem wird überprüft, ob diese Methode eine ausreichende Feinstrukturerhaltung mit sich bringt.

2. Material und Methoden

Als Versuchspflanzen dienten Nektarien von *Euphorbia pulcherrima.* Je 5 Nektarien wurde D-Glucose-^{14}C bzw. L-Leucin-^{14}C über ihren ca. 2,5 mm langen Sockel aus einer 5 µCi (185 K Bq) enthaltenden wäßrigen Lösung 2 Std. lang bei Licht angeboten. Das Leucin, spez. Aktivität 324 mCi, (12 G Bq/mmol), 2,3 mCi (85 M Bq/mg), und die Glucose, spez. Aktivität 280 mCi (10, 4 G Bq/mmol), stammten von Amersham, Fa. Buchler. nach der Fütterung wurden die Nektarien 10 mal in 0,2 M Kakodylatpuffer pH 7,2 bei 4° C gewaschen, um die oberflächlich anhaftende Radioaktivität zu entfernen und mit Filterpapier abgetrocknet.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

A. Trockene Einbettung für das Elektronenmikroskop

Die Nektarien von *Euphorbia pulcherrima* wurden in Anlehnung an FRITZ & ESCHRICH (1970) mit den im folgenden beschriebenen Abhänderungen eingebettet. Nach schockartigem Abkühlen der 1 mm^3 großen Probenstücke in mit flüssigem N_2 verflüssigten Frigen 22 (Freon-Verflüssiger der Balzer-AG) folgte eine Gefriertrocknung in einer Christ-Gefriertrocknungsanlage BETA. Die gefriergetrockneten Gewebestücke wurden 12 Std. lang mit Glutaraldehyd (Glut.)-Dämpfen bei Zimmertemperatur fixiert und anschließend in einem Exsikkator über P_2O_5 aufbewahrt. Die Vakuuminfiltration mit getrocknetem Xylol erfolgte 2 Tage lang in kleinen Gläschen, die in einem vorerst mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, dann mit einer Hochvakuumpumpe evakuierten Exsikkator standen. Bei einigen Proben wurde eine Hydrophobierung mit Silikonöl vorgenommen. Die Vakuuminfiltration mit Xylol-Epon (ohne Beschleuniger), Mischungsverhältnis 2 : 1, 1 : 1, 1 : 3, dauerte jeweils zwischen 6 und 14 Std. bei 20° C. Jeweils einen Tag kamen die Proben dreimal hintereinander in reine Eponlösung, erst beim 4. Mal in Epon mit Beschleuniger. Ein Medium geringerer Viskosität als Epon wäre wegen der rascheren und homogeneren Gewebeinfiltration vorzuziehen. Die stufenweise Erhöhung der Temperatur während der Polymerisation (je 2 Tage bei 40, 50 und 60° C) sollte eine genügende Haftung des Einbettungsmittels an den Zellwänden und ein ausgiebiges Durchdringen des Gewebes mit sich bringen. Ultradünnschnitte wurden mit Glasmessern hergestellt. Da es nicht darauf ankam, weitere Substanzverluste zu verhindern, sondern in erster Linie die Erhaltung der Feinstruktur interessierte, diente als Trogflüssigkeit aqua dest., sonst böte sich nach den Angaben von STEINBISZ (1976) Propandiol – 1,3 an. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert und mit dem Philips EM 201 c untersucht.

B. Sonstige Präparationen für die Elektronenmikroskopie

Bei den übrigen Präparationen erfolgte die Fixierung 2 Std. lang bei 4° C in 2,5% Glut., das mit Na-Kakodylatpuffer auf pH 7,2 eingestellt war, oder unter sonst übereinstimmenden Bedingungen mit 5% (10% bei Leucin) Acrolein bzw. 1% OsO_4. Nach jeder Fixierung wurde mit 1 ml Kakodylatpuffer, pH 7,2, gespült. Ferner wurde eine 10, bei Leucin 20stündige, Räucherung mit 2% OsO_4 bei Zimmertemperatur vorgenommen. Zur Entwässerung diente entweder eine Alkoholreihe (30, 50, 70, 90, 100%), als Zwischenmedium 100% Propylenoxid (je 30 min. bei 4° C) oder eine Acetonreihe (30, 50, 70, 90, 100% bei 4° C), bzw. eine stufenlose Acetonentwässerung nach SITTE (1962) bei Zimmertemperatur.

C. Radioaktivitätsmessung

Die entwässernden Nektarien wurden zur Bestimmung der löslichen Aktivität mit Hilfe von flüssigem N_2 homogenisiert und 5mal mit 80%

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Ethanol extrahiert (8 Teile Ethanol absolut und 2 Teile 0,1 n HCl). Die mit Ethanol nicht extrahierbare Radioaktivität wurde teils mit Hilfe einer Verbrennungsapparatur (HEINRICH & DÁNOS 1978), teils nach Auflösen in Soluen 100 oder 350 (Packard) bestimmt. Soluen 350 weist geringere Chemolumineszenz als Soluen 100 auf, besitzt eine höhere Wasserkapazität und braucht kürzere Auflösungszeiten. Beide Gewebeauflöser ergaben in unseren Versuchen reproduzierbare Werte als die Verbrennung, sie sind dieser auch wegen der leichteren Handhabung vorzuziehen. Der Zusatz von Enzymgemischen (3% Pectinase Mazerozyme – R10 und 3% Zellulase, „Onozuka" – R10, Fa. Vinki Yakult, bzw. Pectinase Acid-Trans-Eliminase und Cellulase der Fa. Miles-Kali-Chemie) erniedrigt die Nutzraten. Die Aktivitätsmessung der Proben erfolgt wie bei HEINRICH & DÁNÓS (1978) angegeben. Zum Abklingen der Chemolumineszenz standen die Proben 12 Std. vor der Messung bei 4° C im Dunkeln. Löschkorrekturkurven wurden für Glut., OsO_4, OsO_4 + H_2O_2, Phenäthylamin, Soluen 350 + „Onozuka" + Mazerozyme und für Epon erstellt. Den prozentualen Angaben in der Tabelle 1 und 2 liegen die mittels der Löschkorrekturkurven korrigierten Nutzraten zu Grunde. Die O-Werte stammen von unfixierten, nicht entwässerten bzw. entwässerten Nektarien.

3. Ergebnisse

A. Extraktionsverluste bei verschiedenen Einbettungsverfahren für die Elektronenmikroskopie

Tabelle 1 zeigt die Gesamtverluste an Radioaktivität, die aus mit D-Glucose-^{14}C gefütterten nach verschiedenen Fixierungen, durch Äthanol- bzw. Acetonentwässerung und im Epon selbst auftreten. Die Verluste im

Tabelle 1.

Radioaktivitätsverluste in % der aufgenommenen Radioaktivität aus mit d-Glucose-^{14}C gefütterten Nektarien von *Euphorbia pulcherrima* im Verlauf verschiedener Fixierungen, Waschen, verschiedenen Entwässerungen und Einbettung in Epon. ° = Räucherung mit dem Fixiermittel, sonst erfolgt Flüssigfixierung, S = 0,2 Saccharoselösung, Acr. = Acrolein.

Entwässerung mit	Fixierung mit						
	Glut.	Acr.	OsO_4	Glut.-OsO_4	Glut.-OsO_4°	Acr.-OsO_4°	OsO_4°
Ethanol	68		72	37			
Aceton	61		71	41			
Ethanol + S	38		48	39			
Aceton + S	37		43	30			
Aceton, stufenlos	33	39	48	33	32	39	8

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Verlauf der Fixierung allein betragen bei Flüssigfixierung mit Glut., Glut.-OsO_4 und Oso_4 zwischen 26 und 41%. Sie lassen sich durch Saccharosezusatz zu den Fixierungsmitteln auf 18 bis 30% in Äthanol und auf 21 bis 25% in Aceton reduzieren. Die Extraktion im Verlauf der Entwässerung beträgt 15 bis 38% im Äthanol, 18–32% im Aceton. Saccharosezusatz zu den Entwässerungsmitteln erniedrigt die Extraktionsverluste auf 9–20% in Äthanol und auf 7–16% in Aceton, stufenlose Acetonentwässerung extrahiert 4–10%. Die Verluste in Epon sind mit 0,5 bis 1,9% der aufgenommenen Radioaktivität zu vernachlässigen. Aus Nektarien, die nach der Fixierung und Entwässerung homogenisiert werden, werden mit 80% Ethanol 19–28% der Gesamtaktivität nach Ethanolentwässerung, 16–26% nach Acetonentwässerung, 21–34% nach Ethanolentwässerung mit Saccharosezusatz und 38–41% nach Acetonentwässerung mit Saccharosezusatz extrahiert. Der unlösliche Radioaktivitätsanteil beträgt ohne Fixierung nur 11%. Nach Flüssigfixierung mit Glut., Glut. – OsO_4 und OsO_4 und Entwässerung liegt die nicht extrahierbare Aktivität zwischen 14 und 16%. Der nicht extrahierbare Anteil macht nach Saccharosezusatz zu den Fixierungs- und Extraktionsmittel zwischen 18 und 34% und nach OsO_4-Räucherung und stufenloser Entwässerung 39% aus. Bei der zuletzt genannten Methode ist noch genügend radioaktives Material in den Schnitten, um eine autoradiographische Lokalisation desselben zu ermöglichen. In Tabelle 2 sind die Extraktionsverluste im Verlauf verschiedener Fixierungen und Entwässerungen nach L-Leucin-^{14}C Angebot angegeben. Sie sind insgesamt geringer als nach der Verfütterung von Glucose. Sie betragen im Verlauf der unterschiedlichen Flüssigfixierungen 17–25% und 2,5 bis 9% während der Entwässerung. Die Verluste in Epon sind mit 2% etwas höher als die nach Glucose-Einbau. Aus homogenisierten Nektarien wurden je nach vorgenommener Fixierung zwischen 11 und 15% der Gesamtaktivität mit Ethanol extrahiert. Nach OsO_4-Räucherung und stufenloser Acetonentwässerung verbleiben 88% der einge-

Tabelle 2.

Radioaktivitätsverluste in % der aufgenommenen Radioaktivität aus mit L-Leucin-^{14}C gefütterten Nektarien von *Euphorbia pulcherrima* im Verlauf von verschiedenen Fixierungen, Waschen, Entwässerungen und Einbettung in Epon. Symbole und Abkürzungen wie Tabelle 1.

Entwässerung mit	Fixierung mit							
	Glut.	Acr.	OsO_4	Glut.-OsO_4	Acr.-OsO_4	Glut.-OsO_4	Acr.-OsO_4°	OsO_4°
Ethanol	28	28	27	33	–	–	–	–
Aceton	27	28	26	30	–	–	–	–
Aceton, stufenlos	25	23	27	32	–	23	24	12

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

brachten Aktivität im Gewebe, nach Homogenisierung und Extraktion desselben noch 75%. Die autoradiographische Lokalisation von Leucin in Ultradünnschnitten erscheint daher weniger problematisch als die von Glucose. Dazu kommt noch, daß Leucin nach 2stündiger Dauermarkierung von *Pisum*-Wurzeln durchschnittlich 89% der Radioaktivität in sich vereinigt (HEINRICH & ABDESAKEN 1979), die Metabolisierung der Glucose aber viel höher ist. Nach 2 Stdn. Dauermarkierung liegen nur ca. 76% der ethanollöslichen Radioaktivität in Zuckern vor, der Rest in Aminosäuren und N-freien Säuren (HEINRICH & KUSCHKI 1978).

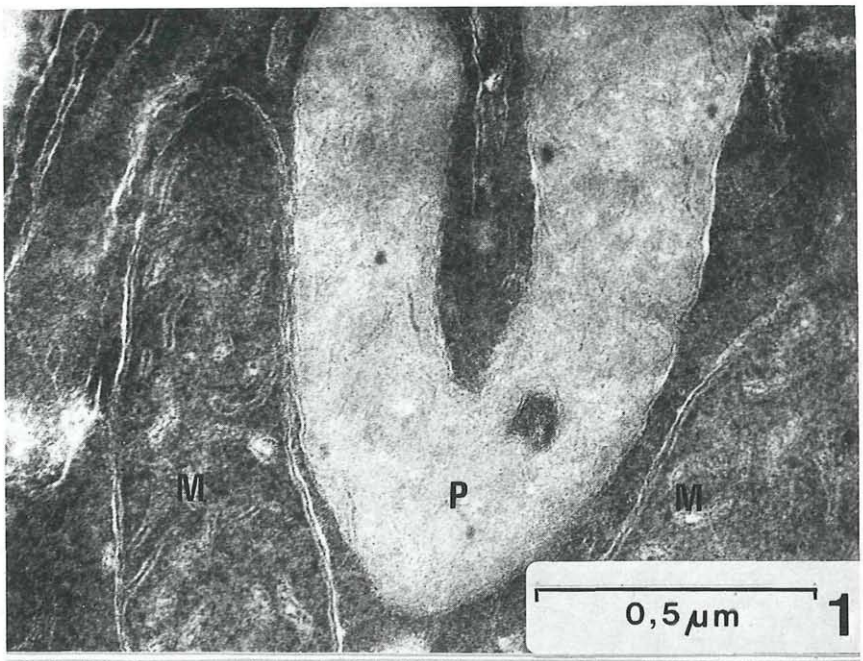
B. Extraktionsverluste im Verlauf der „trockenen" Einbettung

Bei der von FRITZ & ESCHRICH (1970) beschriebenen Methode, die mit Anpassungen an die instrumentelle Ausstattung des Institutes aufgegriffen wurde, treten keine Fixierungsverluste auf. In den Xylol-Zwischenstufen fanden sich 0,8 ± 0,7% der Radioaktivität, die nach d-Glucose-^{14}C Verfütterung vorlag. In den Xylol-Epon-Gemischen und in der reinen Eponlösung fanden sich insgesamt 2,7 ± 1,8%. Es wurde jeweils ein Aliquot von 20 µl nach Lösen in 0,5 ml Methanol gemessen.

C. Strukturerhaltung bei „trockener" Einbettung

Die Strukturerhaltung ist nicht in allen Zellen brauchbar. Abb. 1, 2 und 3 sollen einen Eindruck vom Erhaltungszustand vermitteln. Die nach OsO_4-Flüssigfixierung, konventioneller Entwässerung und Einbettung kontrastreich dargestellten Unit-Membranen erscheinen beio trockener Einbettung im Negativkontrast. Die Dicke der Membranen (SCHNEPF 1964) ist ähnlich wie bei konventionellen Einbettungen (bestimmt durch je 20 Messungen an elektronenmikroskopischen Negativen bei 40.000facher Primärvergrößerung und 40facher Nachvergrößerung mit Hilfe eines Binokulars): Plastiden (Innere Hüllmembran) 6,4 nm. Mitochondrien (innere Hüllmembran) 6,2 nm. ER 6,1 und Plasmalemma 8nm. Die Elementarmembranen sind somit wahrscheinlich dünner als in nicht dehydrierten, mit dem Kryo-Ultramikrotom hergestellten Schnitten (KIND & KRIEG 1973). Der periplastidäre und perimitochondriale Raum, die intrazisternale Phase des ER und die Matrix der Plastiden und Mitochondrien sind etwa von gleicher Elektronendichte wie das übrige Zytoplasma, da die sonst stattfindende Extraktion hydrophiler Substanzen unterbleibt. Von der Strukturerhaltung her ist also die angewandte „trockene Einbettung" geeignet. Hochauflösungs-Autoradiographie zu betreiben. Der Zusatz von Silikonöl führt zu Membranveränderungen, häufig treten Myelinfiguren auf. Da die Auswaschung in unseren Versuchen durch Silikonölzusatz sich nicht wesentlich reduzieren ließ, sollte ein Silikonölzusatz eher unterbleiben.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at



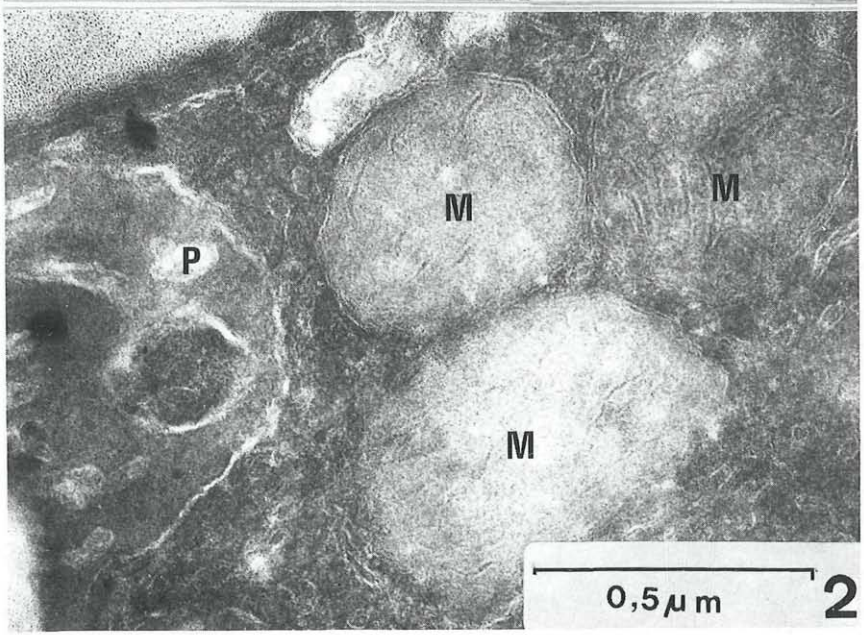
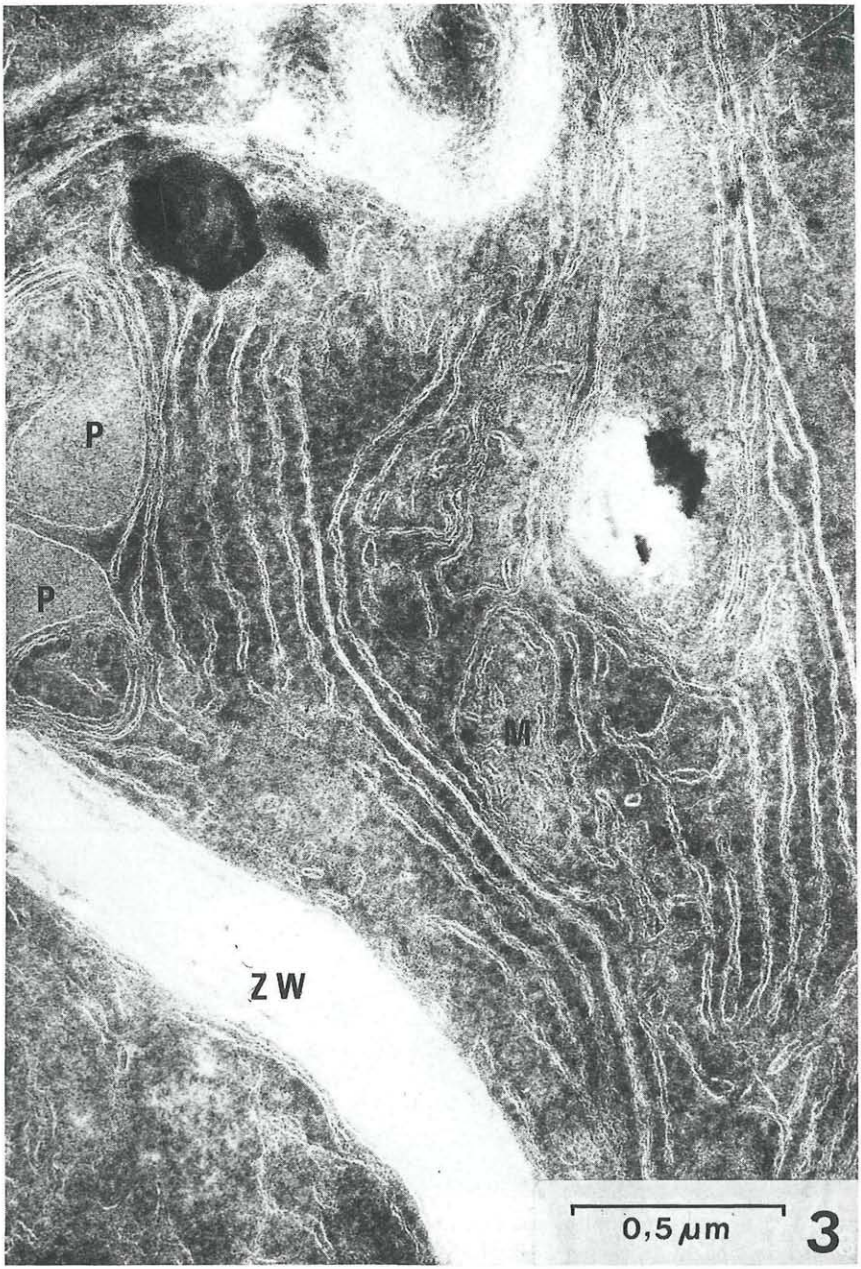


Abb. 1, 2 und 3. Ausschnitte aus den Epithelzellen der Nektarien von *Euphorbia pulcherrima* nach „trockener Einbettung". Die Strukturerhaltung erscheint ausreichend gut, um Autoradiographie im Elektronenmikroskop vorzunehmen. M = Mitochondrien, P = Plastiden, ZW = Zellwand.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at



©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

4. Diskussion

Es ist nicht verwunderlich, daß eine angebotene Aminosäure zu einem geringeren Prozentsatz im Verlauf konventioneller Präparationsschritte bei der Einbettung für die Elektronenmikroskopie extrahiert wird als Glucose. Ebenso wie Lipide reagieren Aminosäuren und Proteine mit OsO_4 (BAHR 1954; PLATTNER 1971, GEYER 1977), durch Glut. werden nach PETERS & ASHLEY (1967) auch freie Aminosäuren im Gewebe gebunden. Zucker gehen keine chemischen Reaktionen ein und verbleiben wahrscheinlich durch Veränderung der Membranlipide und -proteine, also sekundär durch Veränderung der Eigenschaften der Biomembranen im Gewebe. Allerdings muß der Metabolismus der verfütterten Substanz berücksichtigt werden, zumal ein Umbau in andere Monomeren bzw. die Synthese eines polymeren Produktes die Löslichkeit meist verändert. Die angebotene Glucose wird zu einem höheren Prozentsatz metabolisiert als Leucin (HEINRICH, 1975; HEINRICH & ABDESAKEN 1979). Es ist leicht einzusehen, daß bei hydrophilen Stoffen die niederen Äthanol- bzw. Acetonkonzentrationen ebenso viel bzw. mehr extrahieren als die höheren. Dies gilt nicht für lipophile Stoffe, deren Verluste mit steigender Konzentration des Entwässerungsmittels zunehmen (BUSCHMANN & TAYLOR 1971). Ebenso wie die Lipidextraktion durch Fixierung mit Glut. – OsO_4 auf ca. 40% gesenkt wird (MORGAN & HUBER 1967), lassen sich durch Fixierungen mit Glut. oder OsO_4 die Extraktion geringfügig, nach Doppelfixierung deutlich vermindern. Die Verluste im Verlauf der Flüssigfixierung mit OsO_4 und Glut. sind im Falle der Leucininkorporation größer als jene, die während der Entwässerung in Ethanol- und Acetonstufen auftreten. Wenn es also darauf ankommt, die angebotenen radioaktiv markierten Substanzen nicht aus dem Gewebe zu extrahieren, so sollte an Stelle der Flüssigfixierungen Räucherungen vorgenommen werden. So erweist sich eine OsO_4-Räucherung in Kombination mit stufenloser Einbettung (SITTE 1962) als eine Möglichkeit, die Verluste auf ca. ein Drittel jener zu senken, die bei den konventionellen Flüssigfixierungen und stufenloser Entwässerung auftreten. Der von FRITZ & ESCHRICH (1970) vorgeschlagene Einbettungsmodus verringert die Extraktion weiterhin und bietet eine Strukturerhaltung, die auch eine Autoradiographie im EM ermöglicht. Über eventuell auftretende Substanzverlagerungen innerhalb eines Kompartimentes und Anreicherung von Ionen an Kompartimentgrenzen, kann keine sichere Aussage gemacht werden.

Literatur

BAHR G. F. 1954. Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances. Electron stains III. – Exptl. Cell Res. 7: 457–479.

BERNHARD W. & LEDUC E. M. 1967. Ultrathin frozen sections. I Methods and ultrastructural preservation. – J. Cell. Biol. 34: 757–771.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

CHRISTENSEN A. K. 1969. A way to prepare thin sections of fresh tissues for electron microscopy. In: Autoradiography of diffusible substances. – Acad. Press., London, New York.

BUSCHMANN R. J. & TAYLOR A. B. 1971. The effect of 0° C and 2, 4-DNP on the uptake of micellar fetty acid, on the extraction of absorbed lipid during electron microscopy processing, and on the ultrastructure of everted jejunum. – J. Ultrastruct. Res. 35: 98–111.

FRITZ E. & ESCHRICH 1970. ^{14}C-Mikroautoradiographie wasserlöslicher Substanzen im Phloem. – Planta (Berl.) 92: 267–281.

GEYER G. 1977. Lipid fixation. – Acta histochem. Suppl. 19: 209–222.

HEATH B., RETHORET K., ARSENAULT A. L. & OTTENSMAYER F. P. 1985. Improved preservation of the form and contents of wall vesicles and the Golgi apparatus in freeze substituted hyphae of *Saprolegnia*. – Protoplasma 128: 81–93.

HEINEN H. J., WECHSUNG R., VOGT H., HILLENKAMP F. & KAUFMANN R. 1978. Laser-Mikrosonden-Massen-Analysator Lamma. – Biochem. Umschau 2: 346–354.

HEINRICH G. 1975. Über den Glucose-Metabolismus in Nektarien zweier *Aloe*-Arten und über den Mechanismus der Pronektar-Sekretion. – Protoplasma 85: 351–371.

– 1984. LAMMA-Ionenspektren der Fangschleime carnivorer Pflanzen. – Biochem. Physiol. Pflanzen 179: 129–143.

– & ABDESAKEN F. 1979. Extraktionsverluste aus Wurzeln von *Pisum sativum* nach Verfütterung von ^{14}C-Leucin im Verlauf verschiedener Fixierungs- und Entwässerungsmethoden für die Elektronenmikroskopie. – Acta histochem. 64: 37–45.

– & DÁNOS B. 1978. Substanzverluste aus *Gasteria*-Fruchtknoten nach Angebot von ^{14}C-Glucose im Verlauf gebräuchlicher Präparationsmethoden für die Elektronenmikroskopie. – Biochem. Physiol. Pflanzen 172: 615–625.

– & KUSCHKI B. 1978. Verluste radioaktiv markierter Substanzen aus *Pisum*-Wurzeln nach Verfütterung von D-Glucose ^{14}C im Verlauf unterschiedlicher Präparationsmethoden für die Elektronenmikroskopie. – Histochemistry 58: 319–328.

HIPPE S. 1985. Ultrastructure of haustoria of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* preserved by freeze-substitution. – Protoplasma 129: 52–61.

KIND J. & KRIEG J. 1973. Unfixierte Cytomembranen in Gefrierultradünnschnitten. – Cytobiol. 7: 145–151.

LORCH D. W. & SCHÄFER H. 1981. Laser microprobe analysis of the intracellular distribution of lead in artificially exposed cultures of *Phymatodocis nordstedtiana (Chlorophyta)*. – Z. Pflanzenphysiol. 101: 183–188.

MORGAN T. E. & HUBER G. L. 1967. Loss of lipid during fixation for electron microscopy. – J. Cell. Biol. 32: 757–760.

PETERS T. & ASHLEY C. H. 1967. An artefact in radioautography due to binding of free amino acids to tissue by fixatives. – J. Cell. Biol. 33: 53–60.

PLATTNER H. 1973. Die Entwässerung und Einbettung biologischer Objekte für die Elektronenmikroskopie. In: SCHIMMEL G. & VOGELL W., Methoden der Elektronenmikroskopie, 5. Ed. – Wiss. Verlagsges. Stuttgart.

SCHNEPF E. 1964. Beobachtungen am Plasmalemma von *Thyphonium*. – Naturwiss. 13: 318–319.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

SITTE P. 1962. Einfaches Verfahren zur stufenlosen Gewebe-Entwässerung für die elektronenmikroskopische Präparation. – Naturwiss. 49: 402–403.

STEINBISZ H.-H. 1976. Histochemische und autoradiographische Untersuchungen zum Transfer von Assimilaten in grünen Blättern. – Diss. Bonn.

WERNER G., NEUMANN K. & MORGENSTERN E. 1973. Ultradünne Gefrierschnitte von unfixierten und nicht eingebetteten biologischen Objekten. IV. Schneiden ohne Abschwimmflüssigkeiten. – Mikroskopie 29: 27–36.

Phyton (Austria) 27 (2): 309–310 (1987)

Recensio

REITZ Manfred 1986. Die Alge im System der Pflanzen. *Nanochlorum eucaryotum* – eine Alge mit minimalen eukaryotischen Kriterien. – Gr. –8°, 273 Seiten, 68 Abb.; Kunststoffband. – Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. – DM 88,–; ISBN 3-437-30523-9.

Bei der Durchsicht des vorliegenden Bandes kann man zu dem Schluß kommen, daß es im wesentlichen um *Nanochlorum* und dessen systematische Stellung geht. In diesem Falle hat das Werk einen Vorspann von 189 Seiten, der aus 15, mit Ausnahme von 1. und 2., mehrfach untergliederten Abschnitten besteht: Das System der Pflanzen, Stellung der Algen im System der Pflanzen, Organisationsstufen der Algen, die Morphologie, die Physiologie, der Lebenszyklus, die Vermehrung, die Genetik der Algenzelle, Abschnitte über Molekularbiologie und Chromatin, die Notwendigkeit einer molekularen Systematik der Algen, die präbiologische Evolution, die Evolution

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1987

Band/Volume: 27_2

Autor(en)/Author(s): Heinrich Georg, Welz Walter, Swadis Thomas

Artikel/Article: Substanzverluste und Strukturerhaltung im Verlauf einer "trockenen" Einbettung für die Elektronenmikroskopie. 299-309